

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Department) Tübingen
Abteilung I
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Ex-vivo Charakterisierung von T-Zellepitopen des
Hexonproteins von Adenoviren in Abhängigkeit der
HLA-Klasse-I-Restriktion**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Oliver Bičanić

aus Esslingen

2009

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Salih

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Historisches	7
1.2 Stammzelltransplantation	7
1.3 Grundlagen der T-Zell-vermittelten Immunität	9
1.3.1 Entwicklung und Differenzierung von T-Lymphozyten	9
1.3.2 Antigenpräsentation über MHC I und MHC II Moleküle	10
1.3.3 Aktivierung von T-Zellen	10
1.3.4 Zytotoxische T-Zellen	11
1.3.5 T-Helferzellen	11
1.4 Adenoviren	12
1.4.1 Aufbau und Infektionszyklus von Adenoviren	12
1.4.2 Inzidenz einer Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation .	13
1.4.3 Manifestation einer Infektion mit Adenoviren	13
1.4.4 Nachweis von Adenoviren	14
1.4.5 Mortalität einer Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation	14
1.4.6 Therapie einer adenoviralen Infektion nach Stammzelltransplantation	15
1.4.7 Besonderheiten der Immunrestitution bei Virusinfektionen nach	
Stammzelltransplantation	16
1.4.8 Immuntherapie bei Adenovirusinfektionen	18
1.5 Fragestellung	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Probanden	21
2.2 Materialien	22
2.2.1 Geräte sowie Glas- und Plastikmaterial	22
2.2.2 Stammlösungen	23
2.2.3 Material für die Isolierung mononukleärer Zellen	23
2.2.4 Material für die Zellzählung und Mikroskopie	24
2.2.5 Material für die Kultur und Stimulation von T-Zellen	25
2.2.6 Material für die Durchflußzytometrie	26
2.2.7 Material für den ELISPOT-Assay	27
2.3 Methoden	29
2.3.1 Vorhersage von T-Zell-Epitopen mittels SYFPEITHI	29
2.3.2 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mit Ficoll-Hypaque	31
Hintergrundinformation	31
2.3.3 Durchflußzytometrie	32
2.3.4 Ermittlung der intrazellulären IFN- γ -Produktion mittels	34
Intrazellulärfärbung und Messung am Durchflußzytometer	34
2.3.5 Bestimmung IFN- γ -sezernierender Zellen im ELISPOT-Test	36
3. Ergebnisse	38

3.1 Screening gesunder Spender auf adenovirusspezifische T-Lymphozyten mittels intrazellulärer Zytokinfärbung im Durchflußzytometer	38
3.2 Screening gesunder Spender auf peptidspezifische T-Zellen im ELISPOT	40
3.2.1 Peptidscreening gesunder Spender der Klasse HLA-A1 im ELISPOT	42
3.2.2 Peptidscreening gesunder Spender der Klasse HLA-A2 im ELISPOT	44
3.2.3 Peptidscreening gesunder Spender der Klasse HLA-A24 im ELISPOT	47
3.3 Bestimmung der IFN-γ-Produktion von T-Lymphozyten nach Stimulation mit Hexonpeptiden mittels intrazellulärer Zytokinfärbung im Durchflußzytometer	50
3.3.1 Bestimmung der IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten nach Stimulation mit Hexonpeptiden der Klasse HLA-A1	51
3.3.2 Bestimmung der IFN- γ Produktion von T-Lymphozyten nach Stimulation mit Hexonpeptiden der Klasse HLA-A2	52
3.3.3 Bestimmung der IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten nach Stimulation mit Hexonpeptiden der Klasse HLA-A24	53
4. Diskussion	54
Gesunde Spender zeigen eine spezifische T-Zell-Antwort gegen adenovirales Hexonprotein	55
Datenbankgestützte Vorhersagealgorithmen der MHC-Bindung und der proteasomalen Prozessierung ergeben eine Vielzahl möglicher T-Zellepitope	56
Gesunde Spender weisen auf manche dieser Epitope eine spezifische T-Zellantwort auf.....	57
Das Dekapeptid 1945 zeigt eine Immundominanz und ist sowohl im ELISPOT als auch im FACS bei der Mehrzahl der Spender positiv	58
Gesunde Spender weisen mono-, oligo- und poly- Epitop Antworten auf	59
Die verwendeten Methoden bieten die Möglichkeit einer ex-vivo Analyse verbunden mit einer funktionellen Aussage durch Zytokinsekretion.....	60
Schlussfolgerung und Ausblick.....	61
5. Zusammenfassung.....	62
6. Literaturverzeichnis	63
7. Anhang	69

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen:

HAdV	Adenovirus
APC	antigen presenting cells
CD	Cluster of differentiation
CD3	T-Zellmarker
CD4	Expression auf T-Helferzellen
CD8	Expression auf zytotoxischen T-Zellen
CD56	Expression auf NK-Zellen
CMV	Cytomegalovirus
DC	dendritische Zellen
FACS	Fluoreszent activated cell sorter (Durchflußzytometer)
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht im Durchflußzytometer)
GvHD	Graft versus Host Disease
HAdV	humanes Adenovirus
HHV6	humanes Herpesvirus Typ 6
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
KMT	Knochenmarkstransplantation
MHC	Major histocompatibility complex
NK	natural killer cells
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
SSC	Sideward scatter (Seitwärtsstreulicht im Durchflußzytometer)
SZT	Stammzelltransplantation
VZV	Varizella Zoster Virus

1. Einleitung

1.1 Historisches

Im Jahre 1959 wurde von Sir Donnal Thomas und Mitarbeitern die erste Knochenmarkstransplantation von einem eineiigen Geschwisterspender durchgeführt. 1975 erfolgte die erste KMT in Deutschland. Ab Anfang der 80er Jahre erschienen vermehrt Publikationen über die Adenovirusinfektion als Komplikation einer Stammzelltransplantation.^{45,59,68}

Die Adenovirusinfektion ist schon seit seiner Erstbeschreibung in den frühen 50er Jahren²⁷ vermehrt Gegenstand intensiver Forschung geworden. Dabei wurde der Schwerpunkt zunächst auf die Struktur des Adenovirus sowie Möglichkeiten der Therapie bei Adenovirusinfektionen gelegt. In den späten 90er Jahren begann man Adenoviren als Vektoren einzusetzen und damit neue Therapien zu ermöglichen.³⁵ Bei klinischen Versuchen mit adenoviralen Vektoren traten teils lebensbedrohliche Immunreaktionen gegen den Vektor auf. Daraufhin wurde die T-Zellantwort gegen adenovirale Vektoren untersucht.

Die Inzidenz der Adenovirusinfektionen nach Stammzelltransplantation insbesondere bei pädiatrischen Patienten hat seit der Erstbeschreibung in den 80er Jahren sukzessive zugenommen und immer mehr Bedeutung erlangt. Die Mortalität der Adenovirusinfektion beträgt je nach Studie zwischen 6 und 60% und ist vor allem von Faktoren wie Schweregrad und Organbeteiligung abhängig.^{3,10,25,29,36,67} Die Adenovirusinfektion zählt nach dem Rezidiv zusammen mit anderen Infektionen wie CMV und Aspergillus zu den gefährlichen Komplikationen nach einer allogenen Stammzelltransplantation.

1.2 Stammzelltransplantation

Für eine Reihe maligner und nichtmaligner Erkrankungen stellt die Stammzelltransplantation (SZT) die einzige kurative Behandlung dar. Das Prinzip der Stammzelltransplantation besteht in der Transfusion gesunder Stammzellen in Empfänger mit gestörter Blutbildung. Ziel dieser Therapie ist die Ansiedlung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark, welche nach Proliferation und Differenzierung die Blutbildung des Empfängers ersetzen.

Hierbei wird zwischen allogener Transplantation, bei welcher das Transplantat von einem Familien- oder Fremdspender stammt sowie autologer Transplantation unterschieden, bei letzterer werden gesunde, eingefrorene Stammzellen des Empfängers transplantiert. Bei der allogenen Transplantation kann entweder eine „matched family donor“(MFD-SZT), eine „matched unrelated donor“ (MUD-SZT) oder bei Patienten ohne passenden Spender auch eine haploidentische (mismatched family donor = MMFD) Stammzelltransplantation durchgeführt werden.

Die erste Phase der Stammzelltransplantation beinhaltet die Konditionierung. Dabei wird durch Gabe von verschiedenen Chemotherapeutika die Auslöschung des eigenen Knochenmarks angestrebt. Dieser ersten Phase schließt sich eine Transplantation hämatopoetischer Stammzellen an mit der Absicht, die Hämatopoese des Empfängers aus diesen Zellen regenerieren zu lassen. Auf die Transplantation, welche durch Infusion des gesamten Knochenmarks oder der aufgereinigten Stammzellfraktion über einen zentralvenösen Katheter erfolgt, folgt eine Phase der Aplasie, in welcher sich die infundierten Stammzellen in Tochterzellen und Progenitorzellen teilen. Aus letzteren differenzieren sich alle hämatopoetischen Zellen sowie die im peripheren Blut vorkommenden Zelllinien.

Nach allogener Transplantation wird eine Leukozytenzahl $>1000/\mu\text{l}$ bzw. eine Granulozytenzahl $>500/\mu\text{l}$ nach 2-3 Wochen erreicht. Während dieser Phase ist aufgrund der hochgradigen Immuninsuffizienz eine intensivmedizinische Betreuung in speziell belüfteten Einzelzimmern mit Schleuse erforderlich.

Die Nachsorge erstreckt sich bei allogenen transplantierten Patienten auf bis zu 12 Monate. Die Immunrekonstitution erfolgt in einer bestimmten zeitlichen Reihenfolge: als erste werden Granulozyten, dann CD56^+ NK-Zellen gebildet. Erst danach erfolgt ein allmähliches Ansteigen des T- und B-Zellen. Es wird noch bis zu 12 Monate nach Transplantation ein inverses CD4/CD8-Verhältnis sowie eine reduzierte T-Zellfunktion beobachtet.³⁴

Während der Phase der Aplasie kann es zu vor allem zu bakteriellen sowie fungalen Infektionen kommen, die mittels empirischer Kombinationstherapie mit

mehreren Antibiotika und bei gesichertem Nachweis mit Amphotericin B therapiert werden.

Während der Phase der Immunrestitution, das heisst nach erfolgreichem Anwachsen des Transplantats, sind bis zum Ende des ersten Jahres nach Transplantation B- und T-Zellfunktionen transplantierte Kinder noch deutlich erniedrigt.^{2,43} In dieser Phase ist die Gefahr einer viralen Infektion hoch. Als Erreger kommen hierbei vor allem HADV, ferner auch HSV, VZV, CMV, HHV6 in Betracht.^{21,37,47}

1.3 Grundlagen der T-Zell-vermittelten Immunität

1.3.1 Entwicklung und Differenzierung von T-Lymphozyten

Vorläuferzellen der T-Zellen, verlassen das Knochenmark und reifen im Thymus. Deshalb werden sie auch als thymusabhängige (T-) Lymphozyten oder T-Zellen bezeichnet. Die sich im Thymus entwickelnden T-Zellen durchlaufen eine Reihe von Stadien, die man anhand der Expression der Marker CD44 und CD25, CD3, CD4 und CD8 unterscheiden kann. Anfangs sind die Thymozyten doppelt negativ für die Marker CD4, CD8 und CD3. Ebenso haben diese Thymozyten noch keine vollständig ausdifferenzierten α - β - bzw. γ - δ - Ketten, da deren variable Regionen erst mittels somatischer DNA-Rekombination zusammengebaut werden; dieser Mechanismus wird als Genumordnung bezeichnet. Haben sich sodann α - β -T-Zellen gebildet, so werden diese in der weiteren Entwicklung doppelt positiv für die Marker CD4 und CD8 sowie für CD3. Die meisten dieser Zellen gehen in Apoptose (95%), diejenigen Zellen aber, die MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen und so eine positive Selektion durchlaufen, reifen weiter heran und beenden die Expression eines der beiden Corezeptormoleküle. Diese Zellen durchlaufen ebenso eine negative Selektion: dabei werden diejenigen Zellen ausgeschlossen, welche auf Autoantigene ansprechen. Annähernd zwei Prozent der doppelt positiven Thymozyten überleben dieses zweifache Screening und reifen zu einfach positiven T-Zellen heran, die nach und nach aus dem Thymus entlassen werden und das T-Zell-Reservoir der Peripherie bilden.³¹

1.3.2 Antigenpräsentation über MHCI und MHCII Moleküle

T-Zellen können die Anwesenheit eines intrazellulären Krankheitserregers erkennen, weil sie in der Lage sind, Peptidfragmente auf der Oberfläche infizierter Zellen zu erkennen. Diese Peptide werden durch spezialisierte Glykoproteine an die Zelloberfläche transportiert. Diese Glykoproteine werden von einer Gruppe von Genen codiert, welche man aufgrund ihrer starken Wirkung auf die Immunantwort auf transplantierte Gewebe entdeckte und diesen Genkomplex deshalb als Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) bezeichnete und die peptidbindenden Glykoproteine als MHC-Moleküle. Diese werden beim Menschen als HLA (= Human Leukocyte Antigen) bezeichnet.

Jede T-Zelle trägt auf ihrer Oberfläche etwa 30000 Antigenrezeptoren. Jeder einzelne dieser T-Zell-Rezeptoren besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, einer α - sowie einer β -Kette. Jede Kette enthält eine konstante und eine variable Region, die variablen Domänen bilden die Antigenerkennungsstelle. Eine Minderheit von T-Zellen aus anderen Polypeptidketten, den γ - δ - Ketten. Die Funktion dieser T-Zellen innerhalb der Immunantwort ist nicht vollständig geklärt.

T-Zellrezeptoren erkennen ein von einer infizierten Zelle prozessiertes Peptidfragment nur, wenn es auf einem MHC-Molekül der Zellen gebunden ist. MHC-Klasse-I-Moleküle gibt es auf allen kernhaltigen Zellen, in hämatopoetischen Zellen allerdings ist die Expression am höchsten. MHC-Klasse-II-Moleküle dagegen werden nur in einer Untergruppe der blutbildenden Zellen und von Zellen des Thymusstromas exprimiert. So exprimieren B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen neben MHC-Klasse-I-Molekülen auch Moleküle der Klasse MHC-II. T-Zellen exprimieren in aktiviertem Zustand nach Einwirkung des inflammatorischen Zytokins IFN- γ ebenfalls MHC-II-Moleküle.³²

1.3.3 Aktivierung von T-Zellen

Zusätzlich zur Bindung der antigenspezifischen Rezeptoren benötigt eine naive T-Zelle, um aktiviert zu werden, noch costimulatorische Signale. So findet sich

auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen ein homodimeres Molekül aus der Superfamilie der Immunglobuline, B7, welches an das CD28-Molekül der T-Zelle, einem disulfidgebundenen Homodimer, bindet und die T-Zelle zum Wachstum anregt. Die Vorgänge der Proliferation und Differenzierung sind von der Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2, welcher von aktivierten T-Zellen gebildet wird, abhängig und gesteuert. Die sodann entstehenden T-Effektorzellen können jede Zelle erkennen, welche das spezifische den T-Zellrezeptor anregende Antigen trägt, unabhängig davon ob es sich um eine professionelle antigenpräsentierende Zelle handelt oder nicht. Antikörper gegen B7 verhindern die Bindung an CD28 und damit die T-Zellantwort. Bei fehlender Kostimulation besteht nach Bindung des Antigens an den T-Zellrezeptor das Risiko einer Anergie, das heißt die T-Zelle reagiert nicht mehr auf Aktivierung durch professionelle antigenpräsentierende Zellstimulation, es findet keine Aktivierung und somit auch keine Produktion von IL-2 statt und die T-Zelle differenziert nicht zu einer bewaffneten T-Effektorzelle. T-Effektorzellen sind für die zelluläre Immunität zuständig.³¹

1.3.4 Zytotoxische T-Zellen

CD8⁺ zytotoxische Zellen erkennen Peptide, welche auf MHC-Klasse-I-Molekülen exprimiert werden. Nach erfolgter Stimulation reagieren sie mit der Sekretion von Effektormolekülen, welche zur Lyse der virusinfizierten Zellen durch Aktivierung eines Apoptoseprogramms führen. Zytotoxische Effektormoleküle sind hierbei Perforin, Granzyme, FAS-Ligand sowie IFN- γ . Dabei dient das Perforin dazu, durch Polymerisierung Membranporen zu bilden, Granzyme und FAS-Liganden wirken beim Auslösen der Apoptose in der Zielzelle mit. IFN- γ hemmt die virale Replikation, führt zur Aktivierung von Makrophagen und hat große Bedeutung für die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen.

1.3.5 T-Helferzellen

CD4⁺ T-Zellen erkennen Peptide von Krankheitserregern, die in intrazellulären Vesikeln wachsen oder von extrazellulären Bakterien und Toxinen stammen.

Diese werden den CD4⁺ T-Zellen auf Molekülen der MHC-Klasse-II präsentiert. Die aktivierten CD4⁺ T-Zellen können sich sodann in T_H1-Zellen weiterentwickeln, welche mittels der Effektormoleküle IFN- γ , GM-CSF und TNF- α Makrophagen aktivieren oder aber sie werden zu T_H2-Zellen, welche durch die B-Zell-aktivierenden Effektormoleküle IL-4 und IL-5 zur Produktion von Antikörpern führen.

Ein weiteres Differenzierungsprogramm von T_H-Zellen, unabhängig vom T_H1/T_H2 Schema, sind die T_H17-Zellen, welche durch die Koexpression von IL-17, TNF- α , GM-CSF und IL-6 gekennzeichnet sind.

1.4 Adenoviren

1.4.1 Aufbau und Infektionszyklus von Adenoviren

Adenoviren sind unbehüllte Viren mit doppelsträngiger DNA. Sie besitzen ein ikosaederförmiges Kapsid bestehend aus den drei Hauptproteinen Hexon, Pentonbasisprotein und Fiberknöpfchen sowie zahlreichen anderen Proteinen.³⁶ Das Genom humaner Adenoviren (HAdV) besteht aus 36000 Basenpaaren, es ist linear, enthält eine Doppelstrang-DNA mit terminalem Protein, welches kovalent an das 5'-Ende gebunden ist und eine kodierte Protease enthält. Bei humanen Adenoviren wurden bislang 51 verschiedene Serotypen identifiziert, welche in die 6 Subgenera A-F klassifiziert werden.⁵⁷ Bei adenoviralen Infektionen nach Stammzelltransplantation werden vor allem die Subgenera A, B und C detektiert.⁶¹ Aufgrund der Tatsache dass Adenoviren ihr Genom zum Nukleus transportieren und dort eine wirkungsvolle Replikation durchführen, sind sie vermehrt als Vektoren für die Expression und Übertragung therapeutischer Gene eingesetzt worden.³⁵

Der Infektionszyklus der Adenoviren ist in zwei Phasen aufgeteilt: In der Frühphase, welche sich über 6-8 Stunden erstreckt, kommt es zur Bindung des Fiberknöpfchens, eines adenoviralen Strukturproteins, an den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor „CAR“, welches ein Mitglied der Immunoglobulin Superfamilie ist.⁵ Nach diesem „Attachment“ folgt die Bindung des Pentonbasisproteins über eine definierte Arginin-Glycine-Asparagin-Sequenz (RGD) an ein gleiches Sequenzmotiv, welches in einer Reihe von zellulären

Integrinrezeptoren vorkommt.^{50,72} Diese Bindung gewährleistet die Internalisation des Virus in das Innere der Zelle. In der Zelle wird das Virus dann in clathrinbedeckte Vesikel eingeschleust und bei einem sauren pH-Gradienten über die Zusammenarbeit mit Mikrotubuli zum Nukleolus dirigiert. Zusätzlich findet eine Modulation der Zellfunktionen zur Vereinfachung der Replikation der Virus-DNA statt, so dass eine selektive hocheffiziente Transkription und Translation möglich wird. Folge ist die Ansammlung von Strukturproteinen im Nukleus und Reifung des infektiösen Virus. Die Spätphase umfasst einen Zeitraum von 4-6 Stunden. In diesem Zeitraum wird das vollständige Virus aus der Zelle hervorgebracht.⁵⁸

1.4.2 Inzidenz einer Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation

Als Adenovirusinfektion wird die Detektion von Virusmaterial durch Kultur oder PCR von Stuhl, Urin und Sputum definiert. Die Inzidenz einer Adenovirus-Infektion nach Stammzelltransplantation bei pädiatrischen Patienten reicht verschiedenen Studien zufolge von 3%³⁶, 6%²⁰, 12%^{29,62} bis zu 27%⁵⁵. Bei Kindern ist das Auftreten einer disseminierten Adenovirusinfektion ungleich häufiger als bei Erwachsenen.¹⁷ Grund hierfür könnte sein, dass es im Kindesalter zu häufigem Kontakt zu Adenoviren kommt.⁶¹ Die höchste Inzidenz wurde bei Kindern bis 5 Jahren beobachtet.⁶² Patienten, die mit autologen Stammzellen transplantiert wurden, hatten eine niedrigere Inzidenzrate als allogene Transplantatempfänger.³⁶ Weitere Risikofaktoren sind Immunsuppression, GvHD sowie verzögerte Immunrekonstitution.

1.4.3 Manifestation einer Infektion mit Adenoviren

Von einer Adenoviruskrankheit spricht man, wenn klinische Zeichen und Symptome wie Fieber, Zystitis, Enteritis, obere und untere Atemwegsinfektionen oder Manifestationen in Leber oder ZNS bei Patienten mit Adenovirusinfektion vorhanden sind und diese nicht anderweitig erklärt werden können.⁶² Der Zeitpunkt der Erstmanifestation liegt im Mittel zwischen 18³ bis 41 Tagen^{29,36} nach SZT. Das Virus kann durch Tröpfcheninfektion übertragen werden, nach SZT wird jedoch in der Regel von einer endogenen Reaktivierung ausgegangen. Theoretisch ist jedoch auch eine Übertragung der Infektion über

ein Transplantat vom Spender auf den Empfänger möglich. Entgegen der anfänglichen Befürchtungen gehört die Adenovirusinfektion in der Regel nicht zu den nosokomialen Infektionen.⁶⁴

1.4.4 Nachweis von Adenoviren

Die Standarddiagnostik bei Verdacht auf eine Adenovirusinfektion ist die PCR. In der PCR werden Oligonukleotide benutzt, um Basenpaare und Basenpaarefragmente, welche für das Hexonprotein von Adenoviren kodieren, zu amplifizieren. Sie ist eine schnelle Technik, um Adenovirus zum Beispiel aus Abstrichen nachzuweisen.^{13,14,26,41,66} Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass eine Therapieverlaufskontrolle sehr einfach möglich ist und schon früh das Risiko einer disseminierten Adenovirusinfektion erkannt werden kann.⁴² Viruskulturen gehören weiterhin zu den Nachweisverfahren, jedoch sind sie technisch aufwendig und dauern länger als die PCR.⁵²

Eine frühzeitige Diagnose einer Adenovirusinfektion erfolgt unter anderem durch Stuhlproben, ebenso aus Nasopharynx-, Urin- und Blutproben.⁴¹

Eine neue Möglichkeit der Detektion von Adenoviren sind ist die quantitative PCR, mit der es möglich ist, Virusreplikation infektiöser Adenoviren schnell und sensitiv quantitativ nachzuweisen.^{33,61,69}

1.4.5 Mortalität einer Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation

Die adenovirusassoziierte Mortalität bei Patienten nach SZT liegt, je nach Studie, zwischen 6% und 60%, wesentliche Faktoren für die Prognose sind zum einen Ausbreitung und Organbeteiligung,^{3,10,25,29,36,67} zum andern ist das Ausmaß der Immundefizienz von entscheidender Bedeutung.^{15,23,66} Eine Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) und eine Adenovirusinfektion können koexistent vorhanden sein. Vermutungen zufolge könnte eine Adenovirusinfektion eine GvHD triggern, die Immunsuppression bei GvHD erhöht das Risiko einer viralen Infektion und deren Dissemination.^{3,4,36} Sowohl Adeno- also auch Cytomegalieviren sind sehr gefürchtet bei immunsupprimierten Patienten, da sie im Gegensatz zu Immunkompetenten

unter Immunsuppression verlaufen zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen können.

1.4.6 Therapie einer adenoviralen Infektion nach Stammzelltransplantation

In der Literatur gibt es viele Fallstudien sowie einige Kohortenstudien über den Nutzen der Virostatika Ribavirin und Cidofovir bei der Therapie einer HAdV-Infektion bei Kindern nach Stammzelltransplantation^{8,28,41}. Bei beiden Medikamenten wurden sowohl Erfolge wie auch Misserfolge beschrieben. Indessen wurde in all diesen Studien deutlich, dass die schnelle Einleitung einer Therapie nach Diagnosestellung von großer Wichtigkeit ist. Ein wichtiger Kritikpunkt vieler Studien ist, dass simultan zur Therapie keine regelmäßigen Untersuchungen der Immunrekonstitution erfolgten. So berichteten beispielsweise Miyamura et al. über eine erfolgreiche Therapie mit Ribavirin bei Empfängern eines HLA-identischen Geschwisterspenders im Gegensatz zu einer erfolglosen Therapie bei dem Empfänger eines HLA-identischen nicht verwandten Spenders (MUD).⁴⁶ Dieser Unterschied könnte durch die unterschiedliche Kinetik der Immunrekonstitution nach SZT bei diesen Patientengruppen erklärt werden. Cidofovir wurde als effektives Medikament bei der Behandlung einer HAdV-Infektion bei Kindern nach SZT vorgeschlagen.⁴¹ Indessen ist bei immundefizienten Patienten nur eine längerandauernde Therapie erfolgversprechend, diese jedoch könnte bei Behandlung mit Cidofovir eine Nierenschädigung aufgrund der Nephrotoxizität dieses Medikaments zur Folge haben. Hoffman et al. berichteten über eine erfolgreiche Therapie mit Cidofovir, bei welcher durch Verringerung der Dosis von 5mg/kg auf 1mg/kg die Nephrotoxizität verringert wurde.²⁸ Es werden weitere Untersuchungen von großem Interesse sein, bei welchen geringere Konzentrationen an Cidofovir erfolgreich zur Bekämpfung einer adenoviralen Infektion nach Stammzelltransplantation eingesetzt werden, ohne dass es zu einer Nierenschädigung kommt.

Es bleibt festzustellen, dass in der Mehrzahl der Studien, welche die in vivo Effektivität antiviraler Medikamente ohne Wissen über die Immunkompetenz der Patienten bestimmt wurde. Van Tol et al. schlagen deshalb vor, dass neben dem regelmäßigen Monitoring in Stuhl, Urin und Sputum und der PCR-

Nachweis in Plasma oder Vollblut ebenso eine genaue Untersuchung des Immunstatus in Form von Anzahl der CD3⁺ Zellen, welche spezifisch für HAdV sind, sowie deren weitere Verteilung in CD4⁺ und CD8⁺ zu erfolgen hat, damit ein Versagen einer antiviralen Therapie nicht nur aufgrund geringer HAdV-spezifischer T-Zell-Anzahl erfolgt.⁶¹ Sie schlagen weiter vor, zusätzlich Untersuchungen über die Pharmakokinetik dieser Medikamente durchzuführen, da diese vor allem bei Kindern weitestgehend unverstanden ist.

Lange Zeit wurde für kein Medikament die in vitro Wirksamkeit gegen HAdV festgestellt. Neuere in vitro Untersuchungen haben nun gezeigt, dass gegen Cidofovir alle Species sensitiv sind, wohingegen bei Rivavirin nur Spezies C sensitiv ist.⁴⁸

1.4.7 Besonderheiten der Immunrekonstitution bei Virusinfektionen nach Stammzelltransplantation

Im Vergleich zu anderen Viren wie Epstein-Barr-Virus (EBV) und Cytomegalovirus (CMV) ist nur wenig bekannt über die Interaktionen zwischen dem Immunsystem und humanen Adenoviren. Zytokine und neutralisierende Antikörper begrenzen die Ausbreitung der Infektion, NK-Zellen wird eine bedeutende Rolle beim Erkennen und Abtöten HAdV-infizierter Zellen zugeschrieben. T-Zellen gelten als essentiell für die Beseitigung der Infektion.

Bei einer akuten Infektion steigt die Anzahl der antigenspezifischen T-Zellen stark an, nach Bewältigung des Virus sinkt sie wieder. Die Anwesenheit antigenspezifischer T-Zellen ist somit ein Hinweis auf eine Infektion eines Virus in der Anamnese, die Abwesenheit dieser Zellen ein Hinweis auf Abwesenheit des Virus im Organismus oder aber Virusanwesenheit ohne Kontrolle durch die zelluläre Immunabwehr. Sester et al. konnten zeigen, dass die Anzahl adenoviruspezifischer T-Zellen mit dem Alter sinkt.⁵⁷ Dieser Abfall der T-Zell-Antwort war adenoviruspezifisch und nicht nur aufgrund eines generellen Verlusts Interferon- γ -produzierender T-Zellen, da die Frequenz aktivierter T-Zellen, welche mit Staphylokokkenenterotoxin B als polyklonalem Stimulus stimuliert wurden, keinen Zusammenhang mit dem Alter aufwies. Trotz des Abfalls der adenoviruspezifischen T-Zell-Antwort mit dem Alter kommt es bei

Erwachsenen seltener zu Komplikationen in Form von disseminierten Adenovirusinfektionen nach SZT. Sester et al. zufolge könnte dies damit zusammenhängen, dass das Adenovirus im Laufe des Lebens eliminiert wird. Bei Kindern ist die Viruslast noch hoch, die Frequenz HAdV-spezifischer T-Zellen also ebenso. Bei Wegfall dieser Balance zwischen HAdV-spezifischer T-Zellantwort und viraler Replikation, zum Beispiel durch T-Zell-depletierte SZT oder immunsuppressive Therapie, kommt es durch Wegfallen der zellulären Kontrolle zur Infektion. Dieser Zusammenhang zwischen antigenspezifischen T-Zellen und Kontrolle viraler Replikation wurde in einer weiteren Studie von Sester et al. deutlich, bei der ein Abfall CMV-spezifischer T-Zellen mit unkontrollierter viraler Replikation und symptomatischer Krankheit korrelierte.⁵⁶ Die Kontrolle viraler Replikation durch antigenspezifische T-Zellen ist von herausragender Bedeutung für Verlauf und Prognose einer Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation.^{15,23}

Im Gegensatz zu CMV und EBV jedoch wurden erst in der letzten Zeit wenige T-Zellabhängige HAdV-Epitope identifiziert.^{40,51} Eine Besonderheit der Adenoviren ist es, sich durch multiple Mechanismen der Erkennung durch das Immunsystem zu entziehen.⁹ So kodiert bei Adenoviren das frühe Transkriptionsgen E3 Proteine mit immunmodulatorischen Funktionen: Das Binden des E3-Proteins 19K an MHC-Klasse-I-Moleküle im ER infizierter Zellen verhindert die Präsentation viraler Peptide und deren Erkennen und Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten.⁵⁷ Zahlreiche Untersuchungen haben ergeben, dass für die Elimination von Adenoviren die Immunrekonstitution und hierbei vor allem die T-Zell-Antwort von entscheidender Bedeutung ist.

So berichten Hromas et al. in einer Fallstudie über die erfolgreiche Therapie einer Adenovirusinfektion durch Infusion von Spenderlymphozyten.³⁰ Chakrabarti et al. berichten über vier Patienten, bei welchen nach entweder verringerter immunsuppressiver Therapie oder Gabe von Spenderlymphozyten keine Adenoviren mehr nachgewiesen werden konnten.¹¹ In einer weiteren Studie wurde bei einer größeren Anzahl von Patienten deutlich, dass zwischen Immunrekonstitution und Elimination von Adenoviren ein Zusammenhang besteht.¹² Van Tol et al. zeigten in einer retrospektiven Studie mit 328

pädiatrischen Patienten nach Stammzelltransplantation, dass Patienten mit niedrigen T-Zell-Zahlen (entweder CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen) ein hohes Risiko haben, eine Adenovirusinfektion zu entwickeln.⁶² In einer prospektiven Studie derselben Forschungsgruppe überlebten bei Kindern mit Virämie nur diejenigen, deren Lymphozytenanzahl in den ersten vier Wochen nach erstmaliger Diagnose mit PCR mehr als $0,3 \times 10^9/l$ betrug. Dabei war ein Anstieg der Lymphozytenzahlen mit einem Abfall der DNA-Last im Plasma begleitet. Ebenso konnten HAdV-spezifische CD4⁺ T-Zellen sowie ein Anstieg neutralisierender Antikörper, welche spezifisch für die den Patienten infizierenden Serotypen sind, im peripheren Blut nachgewiesen werden.²²

1.4.8 Immuntherapie bei Adenovirusinfektionen

Als präventive Maßnahme zur Verringerung des Risikos der Entwicklung einer Virämie mit HAdV ist die Modulation der Immunkompetenz von entscheidender Bedeutung. Dies kann entweder durch eine verringerte Dosis des immunsuppressiven Medikaments oder durch Infusion von Spenderlymphozyten erfolgen. Beide Maßnahmen jedoch können nicht bei akuter GVHD oder bei bestehender Wahrscheinlichkeit eine solche zu entwickeln durchgeführt werden. Darüberhinaus kann eine alleinige Änderung der immunsuppressiven Therapie nur dann erfolgversprechend sein, wenn Anzeichen einer Immunrestitution vorhanden sind. Van Tol et al. sehen eine Immuntherapie bei Adenovirusinfektionen unter folgenden Bedingungen indiziert: die HAdV-Last im Plasma sollte mindestens 1000 Kopien/ml betragen; es kommt bei einer zweiten Probe nach einer Woche zu einem Anstieg der Viruslast; die Lymphozytenzahlen betragen weniger als $0,3 \times 10^9/l$.⁶¹ Um die Gefahr einer akuten GVHD zu verringern, erscheint die selektive Depletion alloreaktiver T-Zellen, dies sind T-Zellen, die das Gewebe des Empfängers als fremd erkennen und es so zu einer Abstoßungsreaktion kommt, sinnvoll. Bei diesem Ansatz werden dem Patienten nur diejenigen T-Zellen infundiert, welche in der Lage sind, infektiöse Pathogene wie zum Beispiel EBV, CMV und HAdV zur erkennen und so die Anzahl alloreaktiver T-Zellen zu minimieren. Andre-Schmutz et al. hatten mit diesem Ansatz Erfolg und konnten dadurch bei

einigen Patienten spezifische antivirale T-Zell-Immunität zeigen, und obwohl keine schweren Fälle einer akuten GVHD bei dem Patientenkollektiv, welches aus 15 pädiatrischen Patienten bestand, vorkamen, so konnte doch eine akute GVHD nicht bei allen Patienten verhindert werden.¹ Ein anderer, vom Prinzip her ähnlicher Ansatz ist das Generieren HAdV-spezifischer T-Zelllinien von PMNC, wodurch die Anzahl alloreaktiver Zellen ebenfalls verringert wird. In der Praxis müssten solche Kulturen angelegt werden, bevor derjenige HAdV-Serotyp, der den Patienten infiziert hat, nachgewiesen wird. Da aber Heemskerk et al. für T-Zellen, welche mittels HAdV-Serotyp 5 generiert wurden, eine Kreuzreaktivität mit anderen HAdV-Serotypen derselben oder auch anderen Spezies festgestellt haben, scheint dieser Ansatz erfolgversprechend zu sein.²⁴

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, HLA-I restringierte Epitope aus dem adenoviralen Hexonprotein mittels Datenbank-gestützter Algorithmen vorherzusagen und an gesunden Spendern die spezifische T-Zellantwort ex-vivo zu charakterisieren. Aus der formulierten Fragestellung ergeben sich folgende Themen der Arbeit:

1. Wie ist die T-Zell-Antwort gesunder Spender auf humanes Adenovirus-Lysat?
2. Weisen Spender mit einer T-Zellantwort auf komplettes Virus ebenso eine T-Zellantwort auf synthetisch hergestellte, mittels der Datenbank SYFPEITHI ermittelte Peptide? Wie ist diese Antwort charakterisiert?
3. Weisen einzelne Peptide eine Immundominanz (= mehr als 50% der Spender sind positiv) auf?
4. Gibt es Unterschiede in den T-Zellantworten der einzelnen Spender?

Die Identifizierung neuer adenoviraler T-Zellepitope dient dem Zweck, die spezifische T-Zellantwort gegen Adenoviren besser charakterisieren zu können und damit diagnostische und therapeutische Verbesserungen im Umgang mit HADV Infektionen zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Probanden

Untersucht wurden im Zeitraum Oktober 2003 und März 2004 17 freiwillige Spender. 5 dieser Spender (Spender 1 bis 5) wurden als Buffy coats von der Blutspendezentrale Tübingen mit freundlicher Genehmigung von Frau Professor Wernet zur Verfügung gestellt: Dabei wurde für Blutspendezwecke 500ml Vollblut steril abgenommen und für 20min bei 20°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand vom Plasma nach oben und die Erythrozyten nach unten entfernt worden waren, blieb im Blutbeutel ein mit Leukozyten und Thrombozyten angereichertes Blutkonzentrat zurück (Buffy coat).

Bei den übrigen Spendern handelt es sich um 7 männliche und 5 weibliche gesunde Spender, das mittlere Alter dieser Spender beträgt 31 Jahre.

Tabelle 1: Daten der Spender

Datum	Nummer	HLA-Typ	Geschlecht	Alter
03.02.2004	1	HLA-A1	nicht bekannt	nicht bekannt
06.02.2004	2	HLA-A1	nicht bekannt	nicht bekannt
10.02.2004	3	HLA-A1	nicht bekannt	nicht bekannt
12.02.2004	4	HLA-A1	nicht bekannt	nicht bekannt
21.10.2003	5	HLA-A1	nicht bekannt	nicht bekannt
10.10.2003	6	HLA-A1	männlich	35
27.02.2004	7	HLA-A2	weiblich	31
14.01.2004	8	HLA-A2	weiblich	23
27.02.2004	9	HLA-A2	männlich	30
27.02.2004	10	HLA-A2	männlich	27
02.10.2003	11	HLA-A2	weiblich	34
08.01.2004	12	HLA-A2	männlich	25
14.01.2004	13	HLA-A2	männlich	27
14.10.2003	14	HLA-A24	männlich	26
04.03.2004	15	HLA-A24	weiblich	41
15.01.2004	16	HLA-A24	männlich	44
01.10.2003	17	HLA-A24	weiblich	30

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte sowie Glas- und Plastikmaterial

Materialien	Hersteller, Herstellungsort
sterile Werkbank Hera safe	Heräus Instruments GmbH, Fellbach, Deutschland
Brutschrank Hera cell	Heräus Instruments GmbH, Fellbach, Deutschland
Laborzentrifugen: <ul style="list-style-type: none">• Rotixa 50 RS• Rotixa RP	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Blutanalysegeräte: <ul style="list-style-type: none">• Cellcounter HAdVia 120	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
beheizbares Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Vortexer Titramax 100	Heidolph, Deutschland, Nr.: 544 11200 001, SerienNr.: 039902613
Pipettiergerät Pipettboy	Tecnomara AG, Zürich, Schweiz
sterile Plastikpipetten (1, 2, 5, 10, 25ml)	Costar, Cambridge, Großbritannien
verstellbare Pipetten (Pipettman)	Gilson SA, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	Gilson SA, Villiers-le-Bel, Frankreich
PPN – Röhrchen, steril (15ml, 50ml)	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
Reaktionsgefäße, steril (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Handschuhe	Safeskin, Kimberly-Clark, Roswell, GA 30076, USA
Spritzen, steril (10ml, 20ml, 50ml)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Butterfly 21	Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA

2.2.2 Stammlösungen

Materialien	Hersteller, Herstellungsort
Stammlösung A: Medium <ul style="list-style-type: none"> • 500ml RPMI 1640 • 50ml fetales Kälberserum (FCS) • 5ml L-Glutamin (200mM) • 5ml Penicillin (10000U)/ Streptomycin (10mg/ml) • 12,5ml Hepes-Buffer 1M • AB-Serum 	Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Kat.Nr.: F1415, Lot.Nr.: 890FF Gibco Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Kat. Nr.: K0282, Lot.Nr.: 124FF Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Kat.Nr.: A2213, Lot.Nr.: 636F Biochrom AG, Berlin, Kat.Nr.: L1613 Transfusionsmedizin der Universität Tübingen
Stammlösung B: FACS - Puffer	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA

2.2.3 Material für die Isolierung mononukleärer Zellen

Materialien	Hersteller, Herstellungsort
Heparin: <ul style="list-style-type: none"> • Vetren® 200 • Liquemin® 	Byk Gulden, Konstanz, Deutschland Roche, Grenzach Whylen, Deutschland
Ficoll	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphat buffered saline (PBS)	Gibco, BRL, Paisley, Schottland

2.2.4 Material für die Zellzählung und Mikroskopie

Materialien	Hersteller, Herstellungsort
Neubauer Zählkammer	Kästner, München, Deutschland
Deckglas	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland
Inversionsmikroskop	Olympus, Japan

2.2.5 Material für die Kultur und Stimulation von T-Zellen

Material	Hersteller	Herstellungsort	Katalognummer
Pure CD 28	Becton Dickinson	San Jose, USA	340975
Brefeldin A	SIGMA	Taufkirchen, Deutschland	B 76 51
FIX & PERM cell permeabilisation kit	CALTAG Lab.	An der Grub, Österreich	1-800-874-4007
Lyse-Reagenz	Becton Dickinson	San Jose, USA	349202
DMSO	WAK Chemie	Dessau-Tornau, Deutschland	RES 88851
Hexonpeptide	Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie	Tübingen, Deutschland	
Adenovirus Antigen	Bio Whittaker	Walkersville, Maryland, USA	30-800J
MOCK-Reagenz	Bio Whittaker	Walkersville, Maryland, USA	30-801J
SEB (Staphylokokken Enterotoxin B)	Sigma Chemical	St.Louis, USA	11100-45-1, Lot 090K4068, S-4881
15ml Röhrchen	Greiner	Kremsmünster, Österreich	18827103002852
50ml Röhrchen	Greiner	Kremsmünster, Österreich	21026103000018

2.2.6 Material für die Durchflußzytometrie

Geräte, Laborartikel und Reagenzien

FACSCalibur	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
angeschlossene Hardware	Apple, Kalifornien, USA
Auswertungsprogramm CellQuest	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
FACS Flow	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
Analyseröhrchen 5 ml, Rundboden	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA

monoklonale Antikörper

(alle Antikörper stammen von der Firma Becton Dickinson GmbH, San Jose, Kalifornien, USA bzw. Heidelberg, im folgenden abgekürzt als BD)

Antikörper	Markierung	Hersteller	Katalognummer
Mouse γ_1	APC	BD	345 818
Simultest™ γ_1/γ_{2a}	FITC/PE	BD	342 409
Mouse IgG _{2a}	PerCP	BD	349 054
CD3	APC	BD	345 767
CD3	FITC	BD	345 763
CD4	PerCP	BD	345 770
CD8	FITC	BD	345 772

2.2.7 Material für den ELISPOT-Assay

Laborartikel und Reagenzien

Material	Hersteller	Herstellungsort	Katalog-Nr.
Anti-Hu-IFN γ : Mab 1 – D1K	Mabtech AB	Nacka Strand, Schweden	3420–3–40
Anti-Hu-IFN γ : mAB7 – B6 -1 – Biotin	Mabtech AB	Nacka Strand, Schweden	3420–6–250
Reagenz A&B	Mabtech AB	Nacka Strand, Schweden	3420-2A
3-Amino-9-ethyl- Carbazole (AEC)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH	Seinheim, Deutschland	205057 - 7
Spritzenfilter (0,2 μ m)	Sartorius Minisart®	Longmead, Großbritannien	17597020941
Single Use Kwill Filling Tube	AVON Medicals	Hampton Park West, UK	
96-well-Platten: weiß, Multiscreen™	Millipore GmbH	Eschborn, Deutschland	MHABN4550
Zellscraper	Costar®	Cambridge, UK	3010
0,1N Essigsäurelösung	Universitätsapotheke Tübingen		
0,1N Natriumacetatlösung	Universitätsapotheke Tübingen		
Wasser für Injektionszwecke	Ampuwa®, Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland	
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Seinheim, Deutschland	27, 434-8
N,N- Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Seinheim, Deutschland	
Wasserstoffperoxid 30%	Universitätsapotheke Tübingen		

Lösungen und Gemische

PBS/HSA-Gemisch	2,5ml HSA (20%) + 50ml PBS
PBS/HSA/detection-AK-Gemisch	9ml PBS/HSA-Gemisch + 18µl Antihuman IFN-γ
Reagenz A&B-Lösung	9,9ml PBS + 0,1ml Tween 20 + 1 Tropfen Reagenz A + 1 Tropfen Reagenz B
Acetatpuffer	46,9ml Millipore Wasser (oder Ampuwa) + 4,6ml 0,1N Essigsäurelösung + 11ml 0,1N Natriumacetatlösung
AEC-Lösung	2,5ml Dimethylformamid + 1 Tablette AEC + 47,5ml Acetatpuffer + 25 µl H ₂ O ₂ (30%)

Geräte

angeschlossene Hardware: Series 3A Analyzer	Cellular Technology Ltd., Cleveland, USA
Auswertungsprogramm Immunospot	Cellular Technology Ltd., Cleveland, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Vorhersage von T-Zell-Epitopen mittels SYFPEITHI

Die Funktion der MHC-Moleküle ist der Transfer von Information über den aktuellen Bestand von Proteinen innerhalb der Zelle hin zur Zelloberfläche, um so das Immunsystem in die Lage zu versetzen, zu reagieren falls dies notwendig sein sollte. SYFPEITHI ist ein datenbankgestütztes Programm, welches zum einen eine Datenbank für MHC Liganden und Peptidmotive ist, zum anderen für eine begrenzte Anzahl von MHC-Motiven die Vorhersage von Epitopen ermöglicht. Der Name SYFPEITHI leitet sich von dem ersten direkt sequenzierten MHC-eluierten Peptid ab. Es enthält eine Auswahl von MHC-Klasse-I und II Liganden sowie Motive von Menschen und anderen Spezies, wie z. B. Mäusen und Hühnern und wird laufend aktualisiert. Alle Motive sind als individuelle Zugänge erhältlich, es ist möglich, nach MHC Allelen, Motiven und T-Zell-Epitopen zu suchen. Für eine Reihe von MHC Allelen ist es möglich, Epitope mittels SYFPEITHI vorherzusagen.

Für das Hexonprotein von Adenoviren lieferte die Datenbank Vorhersagen für 10 HLA-A1, 13 HLA-A2 sowie 16 HLA-A24 restringierte Peptide, welche im folgenden aufgelistet werden:

Tabelle 2: MHC-Klasse-I restringierte Hexonpeptide

Nr.	Sequenz	Masse	Quelle	Position	MHC
2217	PMDEPTLLY	1077,5	Hexonprotein	908-916	A1
2219	GTEDELPNY	1036,4	Hexonprotein	404-412	A1
2220	GVEGQTPKY	977,5	Hexonprotein	186-184	A1
2222	YTYSGSIPY	1049,5	Hexonprotein	698-706	A1
2227	DIETPDTHISY	1289,6	Hexonprotein	291-301	A1
2239	VLDRGPTFKPY	1291,7	Hexonprotein	105-115	A1
2243	ISDNPN TYDY	1200,5	Hexonprotein	493-502	A1
1961	TNDQAFNDY	1102,4	Hexonprotein	637-645	A1
1945	LTDLGQNLLY	1148,6	Hexonprotein	884-893	A1
1947	LQDRNTELSY	1237,6	Hexonprotein	360-369	A1
2201	ALTDLGQNL	943,5	Hexonprotein	884-892	A2
2200	FLCDRTLWRI	1321,7	Hexonprotein	864-873	A2
2194	ILVKQQNGKL	1139,7	Hexonprotein	249-258	A2
2196	LIGKTAVDSI	1015,6	Hexonprotein	850-859	A2
2198	LLTPNEFEI	1074,6	Hexonprotein	737-745	A2
2193	LLYANSAHAL	1071,6	Hexonprotein	892-901	A2
2214	MLLGNGRYV	1021,5	Hexonprotein	548-556	A2
2195	TLAVGDNRV	943,5	Hexonprotein	85-93	A2
2271	TLLYVLFEV	1095,6	Hexonprotein	914-922	A2
2192	VINTETLTKV	1116,6	Hexonprotein	420-429	A2
2197	VLAGQASQL	885,5	Hexonprotein	347-355	A2
2199	VLFEVFDVV	1065,6	Hexonprotein	918-926	A2
2202	YLNHTFKKV	1148,6	Hexonprotein	713-721	A2
2230	NYIAFRDNFI	1271,6	Hexonprotein	324-333	A*2402
2233	TYSGSSIPYL	999,5	Hexonprotein	699-707	A*2402
2236	LYSNIALYL	1068,6	Hexonprotein	472-480	A*2402
2237	AYSYKARFTL	1218,6	Hexonprotein	76-85	A*2402
1937	KYSPSNVKI	1034,6	Hexonprotein	485-493	A*2402
1938	PYLDGTFYL	1087,5	Hexonprotein	705-713	A*2402
1939	AYPANFPYPL	1151,6	Hexonprotein	840-849	A*2402
1940	TYFSLNNKF	1132,6	Hexonprotein	36-44	A*2402
1941	NYIAFRDNF	1158,6	Hexonprotein	324-332	A*2402
1942	SYDPDVRII	1076,6	Hexonprotein	392-400	A*2402
1943	KYKDYQQVGI	1240,7	Hexonprotein	809-818	A*2402
1944	TYFDIRGVL	1082,6	Hexonprotein	98-106	A*2402
1946	DYMDNVNPF	1113,4	Hexonprotein	526-534	A*2402
1948	DYLSAANML	996,5	Hexonprotein	644-652	A*2402
1954	EYLSPLVQF	1151,6	Hexonprotein	21-30	A*2402
1960	SYKDRMYSF	1195,5	Hexonprotein	785-793	A*2402

2.3.2 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mit Ficoll-Hypaque

Hintergrundinformation

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes können wegen ihrer unterschiedlichen Dichte von anderen Blutbestandteilen durch eine Dichte-zentrifugation mittels Ficoll-Hypaque entsprechend der Methode nach Böyum isoliert werden.

Hierbei setzt man einen Stufengradienten aus dem Polymer Ficoll und der iodhaltigen Verbindung Metrizimid ein, welche eine hohe Dichte besitzt. Verdünntes, heparinisierendes Vollblut wird über eine Ficoll-Hypaque-Schicht (Dichte von 1,077 g/Liter) geschichtet. Nach Zentrifugation flottieren Zellen mit geringerer Dichte (Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) an der Phasengrenze über dem Ficoll, während alle anderen zellulären Blutbestandteile (polymorphkernige Leukozyten, Granulozyten und Erythrocyten) ein Pellet am Boden des Röhrchens bilden. Die mononukleären Zellen können aus der Interphase zwischen Ficoll und verdünntem Plasma mit einer Pipette abgezogen werden. Monozyten können anschließend durch ihr plastikadhärentes Verhalten depletiert werden. Die Zellvitalität wird mit der Trypan-Ausschlussmethode bestimmt.

Durchführung

Heparinisierendes Vollblut (10 I.E./ml) wird mit einer gleichen Menge PBS gemischt, 30 – 35 ml dieser Mischung werden in einem 50 ml Röhrchen vorsichtig auf 15 – 20 ml Ficoll-Hypaque aufgeschichtet. Es folgt die Zentrifugation der Röhrchen für insgesamt 30 min bei 21°C mit 400g; Anlaufzeit 100s, Bremse 0. Mit einer sterilen Pipette wird die oberste Schicht, die das Plasma und die Thrombozyten enthält, entfernt. Mit einer weiteren sterilen Pipette wird sodann die Schicht, welche die PBMCs enthält, vorsichtig abgesaugt und in ein steriles 50ml Röhrchen überführt. Sodann erfolgt das Waschen der PBMCs durch Auffüllen der Röhrchen mit PBS und Zentrifugation bei 400g für 10 min, anschließendem Absaugen des Überstands und Resuspendierung des Zellpellets. Diese Schritte werden einmal wiederholt und

je nach weiterer Verwendung kann das Pellet in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS oder PBS aufgenommen werden.

2.3.3 Durchflußzytometrie

Hintergrund

Die Durchflußzytometrie erlaubt die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Zellsuspension auf Einzelzellebene. Die Zellsuspension wird dazu von dem Meßgerät mit Überdruck in eine Meßküvette aufgenommen und dabei stark beschleunigt. Dadurch trennen sich Aggregate auf und die Zellen können sequentiell durch einen Laserstrahl geführt werden. Dabei werden Streuungseffekte der Zellen und Fluoreszenzen der verwendeten fluoreszierenden Antikörper gemessen. Faktoren, die auf die Lichtstreuung Einfluß nehmen, sind Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile. Das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße, während das dazu im rechten Winkel gestreute Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) von der intrazellulären Granularität abhängt. Es ergibt sich in der Darstellung Seitwärtsstreulicht gegen Vorwärtsstreulicht für Vollblut eine charakteristische Aufteilung der Zellen, in der Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten unterschieden werden können. Zur immunologischen Phänotypisierung werden die Zellen mit Fluochromen konjugierten, monoklonalen Antikörpern inkubiert. Verwendet man unterschiedlich markierte Antikörper, können mehrere Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Voraussetzung dafür ist jedoch neben einer gemeinsamen Anregbarkeit der Farbstoffe bei einer bestimmten Wellenlänge, daß die Gipfel der einzelnen Emissionsmaxima deutlich unterschiedlich sind und so mit verschiedenen Detektoren getrennt voneinander in bestimmten Kanälen gemessen werden können. Moderne FACS – Geräte besitzen deshalb mehrere Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge, so daß sich das Spektrum der gleichzeitig einsetzbaren Farbstoffe deutlich erweitert. Häufig verwendete Farbstoffe sind z.B. Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), PerCP oder Allophycocyanin (APC).

Das für die Messungen dieser Arbeit verwendete Gerät arbeitet mit zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge und es können bis zu vier verschiedene Farbstoffe gleichzeitig verwendet werden.

Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen Antikörper auf der Zelloberfläche. Da die meisten Zellen auch ohne eine Anfärbung eine gewisse Autofluoreszenz aufweisen, muß immer eine Isotypkontrolle der Zellen gemessen werden, um festlegen zu können, ab welcher Fluoreszenzintensität die Zellen als positiv gelten.

Durchführung

A Immunfluoreszenzfärbung

Die zu untersuchenden Zellen, z.B. isolierte mononukleäre Zellen werden auf 1 Mio/ml eingestellt. Jeweils 10 µl der fluoreszierenden monoklonalen Antikörper werden in den gewünschten Kombinationen in Röhrchen vorgelegt. In jedes dieser Röhrchen werden 100 µl der Zellsuspension pipettiert. Die Proben werden geschüttelt (Vortexer) und für 20 min im Kühlschrank unter Lichtabschluß inkubiert. Es folgt das Auffüllen der Röhrchen mit Pufferlösung, Zentrifugation bei 400g für 10 min bei 10°C und anschließende Dekantierung. Die gefärbten Zellen werden resuspendiert und unter Lichtabschluß im Kühlschrank bis zur Messung, die bis spätestens einen Tag nach der Färbung erfolgen sollte, aufbewahrt.

B Messung und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Messung erfolgt mit dem Durchflußzytometer FACSCalibur, die Auswertung mit der zugehörigen Software CellQuest. Ausgehend von Routineeinstellungen wurden die genauen Meßeinstellungen anhand der Kontrollen durchgeführt:

Die Verstärkerspannungen für FSC und SSC wurden so eingestellt, daß in der SSC-gegen- FSC- Darstellung (SSC: y-Achse, FSC: x-Achse) die übliche Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen zustande kam. Um die Zielpopulation, die Lymphozyten, konnte in dieser Darstellung ein Gate gesetzt

werden; dies erlaubte die Darstellung nur dieser Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz in einem weiteren Diagramm.

Anhand der Kontrollfärbung wurden nun die Verstärkerspannungen der verschiedenen Meßkanäle so eingestellt, daß sich die Zellen im jeweiligen Kanal zwischen 10^0 und 10^1 der Fluoreszenzskala befanden. Nach der Geräteeinstellung erfolgte die Messung der Proben. Zur Auswertung wird wieder ein Gate auf die Lymphozytenpopulation gesetzt; diese Zellen werden dann in einem weiteren Diagramm hinsichtlich ihrer Fluoreszenz dargestellt, wobei immer zwei Kanäle gegeneinander dargestellt werden, z.B. FITC gegen PE. Zur statistischen Auswertung wird in dieses Diagramm ein Quadrant gesetzt, der es erlaubt, Zellen als doppelt negativ, einfach positiv oder doppelt positiv zu definieren. Die absoluten und relativen Häufigkeiten dieser verschiedenen Zellen werden von der Software automatisch berechnet.

2.3.4 Ermittlung der intrazellulären IFN- γ -Produktion mittels

Intrazellulärfärbung und Messung am Durchflußzytometer

Hintergrund

Durchflußzytometrische Analysen mit monoklonalen Antikörpern waren herkömmlich primär auf Oberflächenmoleküle beschränkt. Aus diesem Grund entzogen sich intrazelluläre Antigene wie zytoplasmatische oder nukleäre Enzyme, Onkoproteine, Zytokine, Immunglobuline usw. weitgehend solchen Messungen. Genauso waren Studien zur zytoplasmatischen Lokalisierung einiger gut bekannter membranassoziierter Moleküle, wie z. B. CD3 und CD 22, nicht möglich.

Die intrazelluläre FACS-Färbung ermöglicht die Messung intrazellulärer Antigene unter der Voraussetzung, dass spezifische Antikörper verwendet werden. Für diese Arbeit wurde FIX & PERM von Caltag Laboratories verwendet. Voraussetzung für eine intrazelluläre Anfärbung der Antigene ist hierbei die Vorbehandlung der Zellen mit einem Fixationsreagenz

(Formaldehyd) und eine Permeabilisierung (mit Saponin als Detergenz) der Zellen. Diese Vorgehensweise befähigt Antikörper intrazelluläre Strukturen zu erreichen, ohne gleichzeitig morphologische Scatter-Eigenschaften der Zellen zu verändern.

In dieser Arbeit werden die T-Lymphozyten entweder in Vollblut oder nach Isolierung aus peripherem Blut mit Hilfe eines Ficoll-Hypaque®-Gradienten mit Hexonpeptid und CD 28 stimuliert, um eine ausreichende Kostimulation zu gewährleisten. Für die Stimulation wurden mittels SYFPEITHI ermittelte Peptide verwendet (freundlicherweise hergestellt und zur Verfügung gestellt von der immunologischen Abteilung der Uniklinik Tübingen unter Herrn Prof. Rammensee). Die als Lyophilisate vorhandenen Peptide wurden mit DMSO und PBS in Lösung gebracht, aliquotiert und sodann bei -80°C gelagert. Die T-Lymphozyten wurden nach einer 12h-Stimulation maximal 4-6h mit Brefeldin A, welches den intrazellulären Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat blockiert, weiterbehandelt, um das durch die Stimulation synthetisierte IFN- γ am Austritt aus der Zelle zu hindern.

Durchführung

500 μ l Vollblut oder Zellen nach Ficoll werden in 15ml PPN-Röhrchen mit 1 μ g/ml Peptid und 1 μ g/ml CD 28 für insgesamt 12h bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Es ist darauf zu achten, dass die Röhrchen flach im Brutschrank liegen, um eine zu starke Konzentration der Zellen zu verhindern. Es folgt die Zugabe von 1 μ l/ml Brefeldin A, anschließend Inkubation bei 37°C für 4h, danach Auffüllen der Proben mit PBS, Zentrifugation bei 400g, 10 min, 4°C und Dekantieren des Überstands. Nun erfolgt die Färbung der Oberflächenmoleküle wie oben beschrieben. Danach werden 100 μ l Fixationsmedium je Probe zugegeben, anschließend folgt eine 15minütige Inkubation lichtgeschützt bei 21°C.

Die Röhrchen werden nun mit PBS aufgefüllt, abzentrifugiert (400g, 10min, 10°C) und dekantiert. 100 μ l Permeabilisierungsreagenz werden je Probe zugegeben. Es folgt Resuspendieren mit einer 100 μ l Pipette und Zugabe des IFN- γ Antikörpers. Nach einer 30minütigen Inkubation lichtgeschützt bei Raumtemperatur werden die Proben mit Stammlösung C aufgefüllt, abzentrifugiert (400g, 10 min, 10°C) und dekantiert. Die gefärbten Zellen

werden resuspendiert und unter Lichtabschluß bei 4°C bis zur Messung aufbewahrt

2.3.5 Bestimmung IFN- γ -sezernierender Zellen im ELISPOT-Test

Hintergrund

Der ELISPOT-Test ist eine Variante des Sandwich-ELISA-Tests, der bei der Bestimmung der Häufigkeit von T-Zellreaktionen angewendet wird.

Hierbei werden die zu untersuchenden Zellen mit Antigen stimuliert und dann in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Die Vertiefungen sind mit Antikörpern gegen das Zytokin beschichtet, das untersucht werden soll, in diesem Fall von spezifischen Zellen sezerniertes IFN- γ . Wenn eine aktivierte Zelle IFN- γ freisetzt, wird das Molekül auf der Kunststofffläche von dem Antikörper festgehalten. Nach einiger Zeit entfernt man die Zellen und gibt einen zweiten Antikörper gegen IFN- γ in die Vertiefungen. Um jede aktivierte Zelle bildet sich nun ein Hof von Zytokin-Antikörper-Komplexen, welcher mittels einer enzymatisch gesteuerten Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Aufgrund der Zahl der entstanden Flecke = Spots und der bekannten Zahl der eingesetzten Zellen lässt sich die Häufigkeit spezifischer Zellen errechnen, die IFN- γ produzieren.

Durchführung

1. Die Mikrotiterplatte wird mit primärem Antikörper steril inkubiert:

Hierbei wird der Antikörper 1/100 mit PBS verdünnt. Es folgen eine sterile Beschichtung der Platte mit 50 μ l/well dieser Verdünnung und eine anschließende Inkubation bei 4°C für 12h.

2. Waschen der Platte:

Steriles Dekantieren der Platte, anschließend 200 μ l/well PBS zugeben, 5min inkubieren und wieder dekantieren. Diesen Schritt dreimal wiederholen.

3. Färben der Platte:

Um eine gleichmäßige Hintergrundfärbung der Platte zu erreichen wird in jedes Well 150 μ l Medium pipettiert und anschließend bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert.

4. Inkubation mit Zellen:

Nach sterilem Dekantieren folgt die Gabe von 50µl/well Responderzellen, welche vorher auf 10×10^6 /ml eingestellt wurden. Daraufhin wird die Platte bei 37°C und 5%CO₂ mindestens 15min lang inkubiert.

5. Stimulation:

Antigene werden zugegeben, jedes Well wird mit Medium auf 200µl aufgefüllt. Anschließend wird die Platte für mind. 20h im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert.

6. Waschen der Platte:

In einer Schüssel wird die Platte in 500ml PBS und 2,5ml Tween 20 gewaschen, über Kopf dekantiert und anschließend gut ausgeklopft. Dieser Schritt wird insgesamt sechsmal durchgeführt.

7. Mikrotiterplatte wird mit sekundärem Antikörper inkubiert:

Je well werden 100µl eines PBS/HSA/Antikörper-Gemischs (10ml PBS + 0,5ml HSA20% + 20µl Antihuman IFN-γ) zugegeben. Die Platte wird daraufhin für 2h bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank inkubiert.

8. Waschen der Platte:

Erneutes Waschen wie in 6. beschrieben.

9. Inkubation mit Reagenz A&B:

Die Grundlage für die enzymatische Farbreaktion ist ein Streptavidin-Biotin-Komplex, welcher mittels der Reagenz A&B-Lösung (9,9ml PBS + 0,1ml Tween 20 + 1 Tropfen Reagenz A + 1 Tropfen Reagenz B) gewonnen wird. Von dieser Lösung werden 100µl je well auf die Platte gegeben und 1h bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert.

10. Waschen der Platte.

Dreimal wie in 6. beschrieben, dreimal ohne Tween 20.

11. Sichtbarmachung der enzymatischen Farbreaktion:

Für ca. 5min werden 100µl je well AEC-Lösung (2,5ml Dimethylformamid + 1 Tablette AEC + 47,5ml Acetatpuffer + 25µl H₂O₂30%) pipettiert.

12. Waschen:

Platte unter fließendem Wasser abspritzen und auswaschen, bis keine überschüssige Farbe mehr zu sehen ist.

13. Trocknen lassen und anschließend im ELISPOT-PC auswerten.

3. Ergebnisse

3.1 Screening gesunder Spender auf adenoviruspezifische T-Lymphozyten mittels intrazellulärer Zytokinfärbung im Durchflußzytometer

Zu Anfang werden 12 gesunde, HLA-typisierte Spender zwischen 20 und 50 Jahren sowie 5 Buffy coats, freundlicherweise bereitgestellt von Frau Prof. Wernet von der Blutspendezentrale Tübingen, auf eine T-Zellantwort auf adenovirales Antigen untersucht. Dies erfolgt mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und Messung im Durchflußzytometer. Als Antigen wird ein Adenovirus-Lysat verwendet. Als Negativkontrolle dient eine Mock-Kontrolle, Positivkontrolle ist Staphylokokkenenterotoxin B. Gefärbt wird mit den Antikörpern CD3, welches an das rezeptorassoziierte CD3-Protein der T-Zellen bindet, sowie mit CD4 und CD8, welche an den Corezeptoren binden und anhand derer sich die großen Untergruppen der T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen sowie CD8⁺ cytotoxische T-Zellen, unterscheiden lassen.

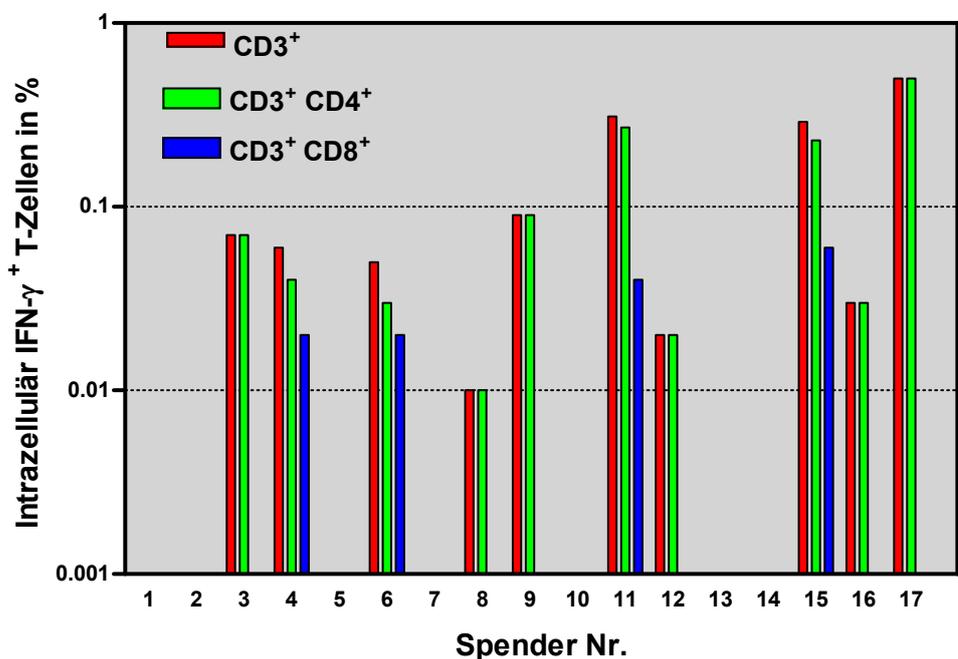


Abbildung 1:

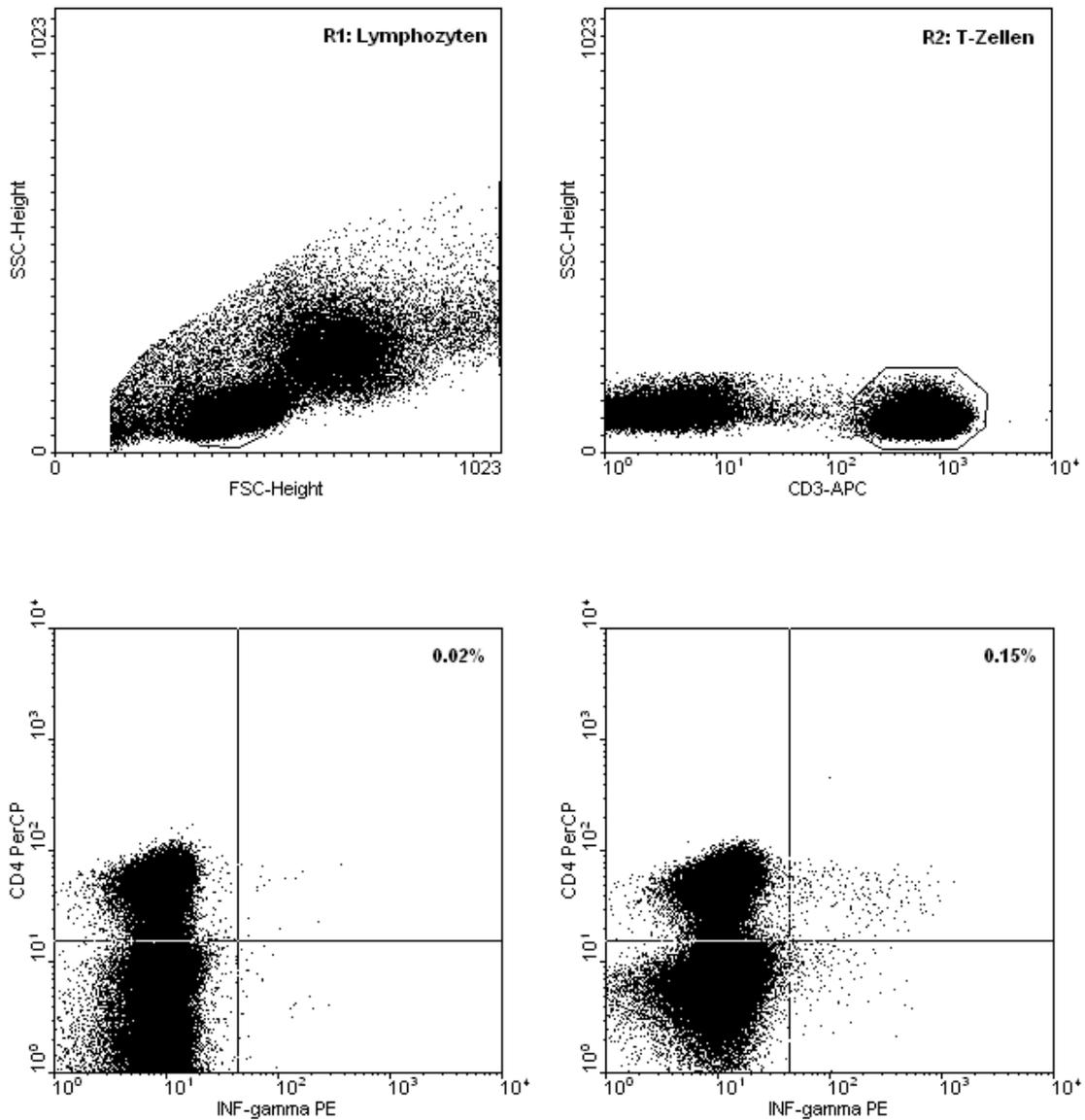
Durchflußzytometrische Bestimmung der T-Zellantwort auf HAdV-Lysat.

Von 17 Spendern zeigen 10 eine spezifische T-Zellantwort.

Von 17 HLA-typisierten Spendern zeigen 10 Spender eine adenovirusspezifische Antwort auf adenovirales Protein (59% positive Spender). Als „positiv“ wird eine IFN- γ -Antwort von mehr als 0,01% CD4⁺ oder CD8⁺-Zellen bezeichnet, bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle.

Der Median aller Spender beträgt 0,03% CD3⁺ Zellen, mit einem Minimum von 0% und einem Maximum von 0,5%, der Mittelwert beträgt 0,09% +/-0,15. Bei den 10 positiven Spender ist die T-Zell-Immunantwort vorwiegend CD4 dominiert mit einem Mittelwert von 0,09% CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Nachfolgende Abbildung zeigt, dass die untersuchten Zellen mittels ihrer morphologischen Scattereigenschaften unterschieden werden: in R1 sind Lymphozyten erfasst, welche klein sind und keine Granula besitzen, somit im FSC und SSC nieder sind. Dies sind T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, nur diese Zellen werden analysiert. Alle übrigen Zellen, Granulozyten, Thrombozyten und Zelldetritus werden durch die Anwendung eines Gates nicht mehr berücksichtigt. In R2 sind diejenigen Zellen aus R1, welche CD3-positiv sind. In R2 sind also nur T-Zellen. In nachfolgenden Abbildungen, in welchen die CD4-positiven Zellen eines Spenders auf Adenovirus-Lysat mit einer Mock-Kontrolle als Negativ-Kontrolle zu sehen sind, werden die T-Zellen gemessen (R1 und R2).



Mock-Kontrolle:

0,02% CD4⁺ IFN-γ⁺ T-Zellen

Adenovirus-Lysat:

0,15% CD4⁺ IFN-γ⁺ T-Zellen

Abbildung 2:

IFN-γ Antworten auf Mock-Kontrolle und auf Adenovirus-Lysat

3.2 Screening gesunder Spender auf peptidspezifische T-Zellen im ELISPOT

Nach erfolgtem Screening auf Adenovirus-Lysat sowie der HLA-Typisierung der freiwilligen Spender folgt nun das Screening auf peptidspezifische T-Zellen.

Dabei werden bei n=6 HLA-A1 typisierten Spendern n=10 HLA-A1 restringierten Hexonpeptide getestet, bei n=7 HLA-A2 positiven Spendern und n=4 HLA-A24 positiven Spendern werden jeweils n=10 HLA-A2 sowie n=8 HLA-A24 restringierte Hexonpeptide verwendet.

Als Screening dient hierbei der ELISPOT-Test, eine Variante eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA), der als direkter Bindungstest spezifische Bindungen nachweist.

Die mittels Ficoll-Hypaque isolierten sowie mit Hexonpeptid stimulierten und somit aktivierten Zellen sezernieren das Zytokin IFN- γ , welches an die Antikörper auf der Kunststoffoberfläche einer Mikrotiterplatte bindet. Dadurch lässt sich um jede aktivierte T-Zelle ein Hof von gebundenem Zytokin sichtbar machen und die Häufigkeit von T-Zellen berechnen, die dieses Zytokin freisetzen. Im folgenden wird ein solcher Hof um eine aktivierte T-Zelle als spot forming cell (SFC) bezeichnet. Die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden als wells bezeichnet, welche mit Antikörper beschichtet sind. Als positive Antwort werden mindestens 5 SFC (= spot forming cells) je 100.000 Zellen je well gewertet.

3.2.1 Peptidscreening gesunder Spender der Klasse HLA-A1 im ELISPOT

Im folgenden wird der Anteil der Spender mit positiver Antwort angegeben, ein Peptid, welches bei mehr als 50% der Spender positiv ist, wird als immundominantes Peptid bezeichnet.

5 von 6 HLA-A1 Spendern sind 83% der Spender positiv für das Dekapeptid 1945 mit der Aminosäuresequenz LTDLGQNLLY. Der Median aller Spender beträgt 11 SFC für das Hexonpeptid 1945, mit einem Minimum von 1 SFC und einem Maximum von 23 SFC, der Mittelwert beträgt 11 SFC \pm 8.

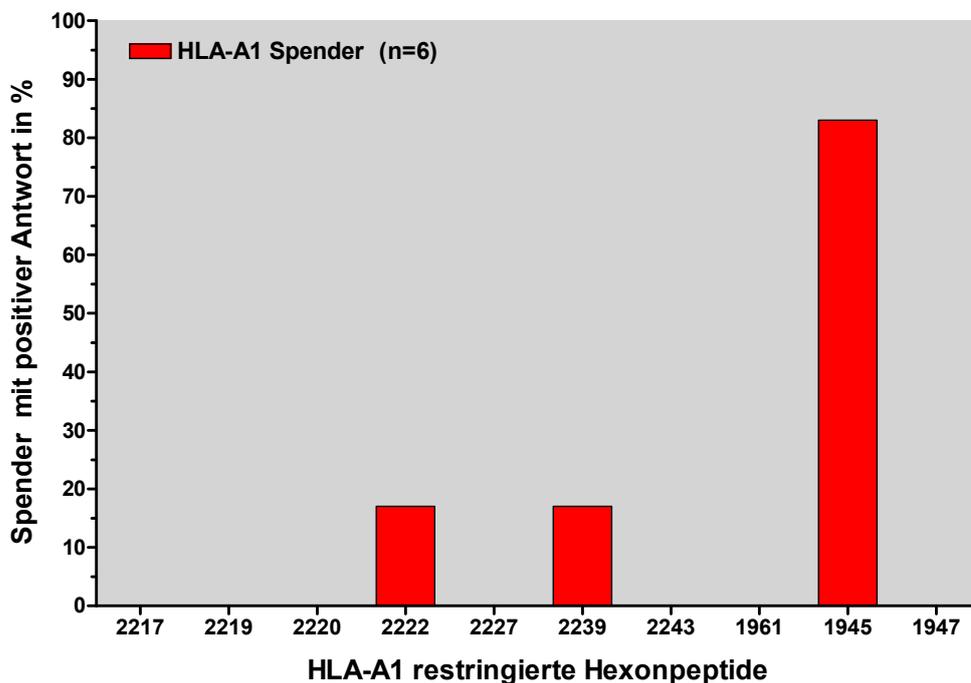


Abbildung 3:

Relativer Anteil gesunder Spender der Klasse HLA-A1, mit einer positiven Antwort im ELISPOT auf HLA-A1-restringierte Hexonpeptide:

5 von 6 HLA-A1 Spendern sind positiv für das Dekapeptid 1945 mit der Aminosäuresequenz LTDLGQNLLY.

In Abbildung 4 ist eine interindividuelle Varianz der Spender zu sehen, dass heisst einzelne Spender (z.B. Spender 3 und 6) zeigen sowohl auf das immundominante Peptid 1945 eine Antwort als auch auf nichtimmundominante Peptide.

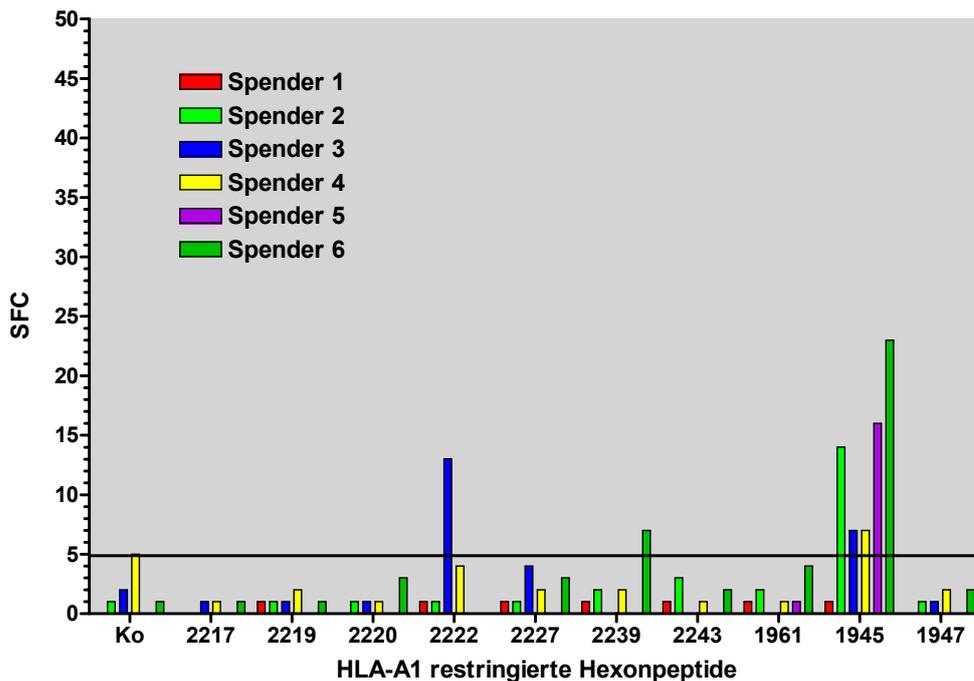


Abbildung 4:

IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A1 auf HLA-A1 restringierte Hexonpeptide im ELISPOT:

Es zeigt sich eine interindividuelle Spendervarianz durch eine Antwort einzelner Spender sowohl auf das immundominante Epitop 1945 als auch auf nicht-immundominante Epitope.

In Abbildung 5 wird die IFN- γ -Antwort der 5 positiven Spender auf das Hexonpeptid 1945 mit der Aminosäuresequenz LTDLGQNLLY der Antwort auf Adenovirus-Lysat gegenübergestellt.

Es wird der prozentuale Anteil der IFN- γ Antwort angegeben, den das Peptid an der Antwort desselben Spenders auf Adenovirus-Lysat ausmacht.

Der Median der adenoviruspezifischen Antwort des Hexonpeptids LTDLGQNLLY beträgt 4% mit einem Minimum von 1,9% und einem Maximum von 33,8%. Der Mittelwert beträgt 12% \pm 13,57.

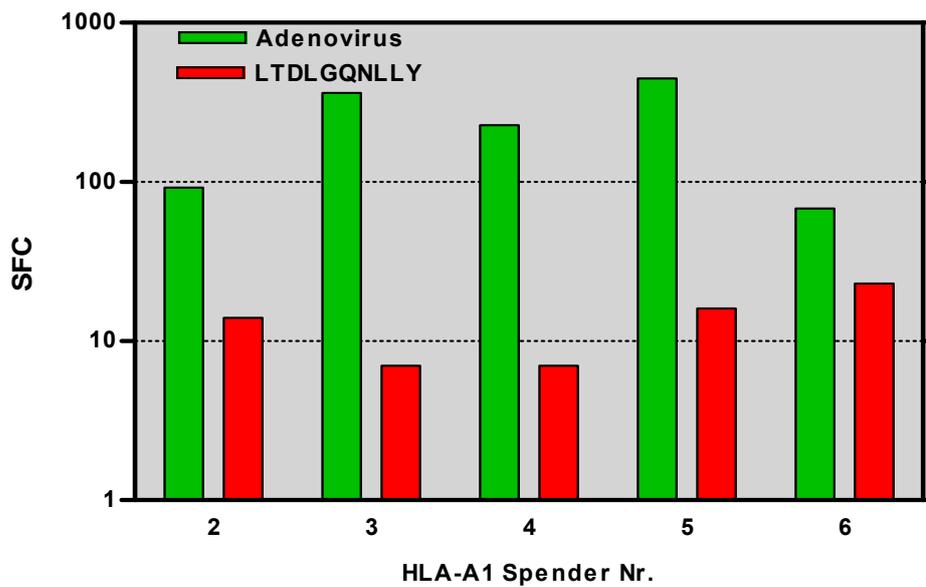


Abbildung 5:

IFN- γ -Antwort gesunder Spender auf Adenovirus-Lysat und das HLA-A1 restringierte Dekapeptid LTDLGQNLLY im ELISPOT:

Die adenoviruspezifische Antwort des Hexonpeptids LTDLGQNLLY beträgt 33,8% der Antwort auf Adenovirus-Lysat.

3.2.2 Peptidscreening gesunder Spender der Klasse HLA-A2 im ELISPOT

Beim Screening auf peptidspezifische Zellen bei Spendern der Klasse HLA-A2 ist ebenso ein Peptid bei mehr als 50% der Spender positiv, allerdings hier nur bei 4 von 7 Spendern (57%).

Der Median der Antwort auf das Dekapeptid 2200 mit der Aminosäuresequenz FLCDRTLWRI beträgt 5SFC mit einem Minimum von 1 und einem Maximum von 14 SFC. Der Mittelwert beträgt 6 SFC \pm 5.

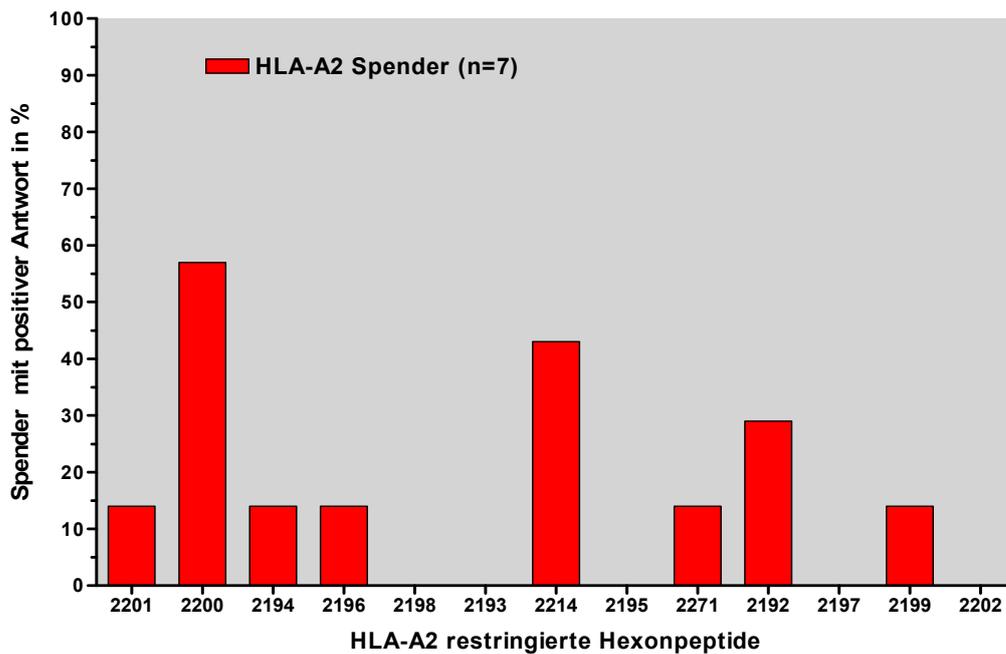


Abbildung 6:

Relativer Anteil gesunder Spender der Klasse HLA-A2, mit einer positiven Antwort im ELISPOT auf HLA-A2-restringierte Hexonpeptide:

4 von 7 Spendern (=57%) sind positiv für das Dekapeptid 2200 mit der Aminosäuresequenz FLCDRTLWRI.

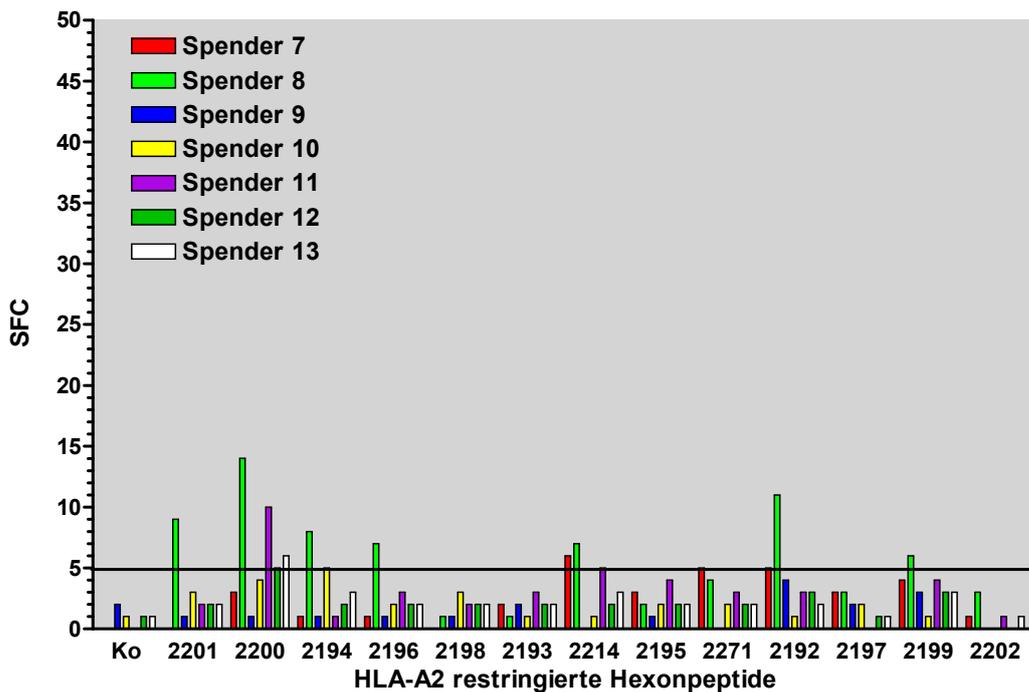


Abbildung 7:

IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A2 auf HLA-A2 restringierte Hexonpeptide im ELISPOT, Mittelwerte aller Spender:

Es zeigt sich bei Spender 8 eine interindividuelle Spendervarianz.

In Abbildung 8 wird die IFN- γ -Antwort der 4 positiven Spender auf das Hexonpeptid 2200 mit der Aminosäuresequenz FLCDRTLWRI der Antwort auf Adenovirus-Lysat gegenübergestellt.

Der Median der adenoviruspezifischen Antwort des Hexonpeptids FLCDRTLWRI beträgt 5% mit einem Minimum von 4% und einem Maximum von 10%, der Mittelwert beträgt $6\% \pm 3$.

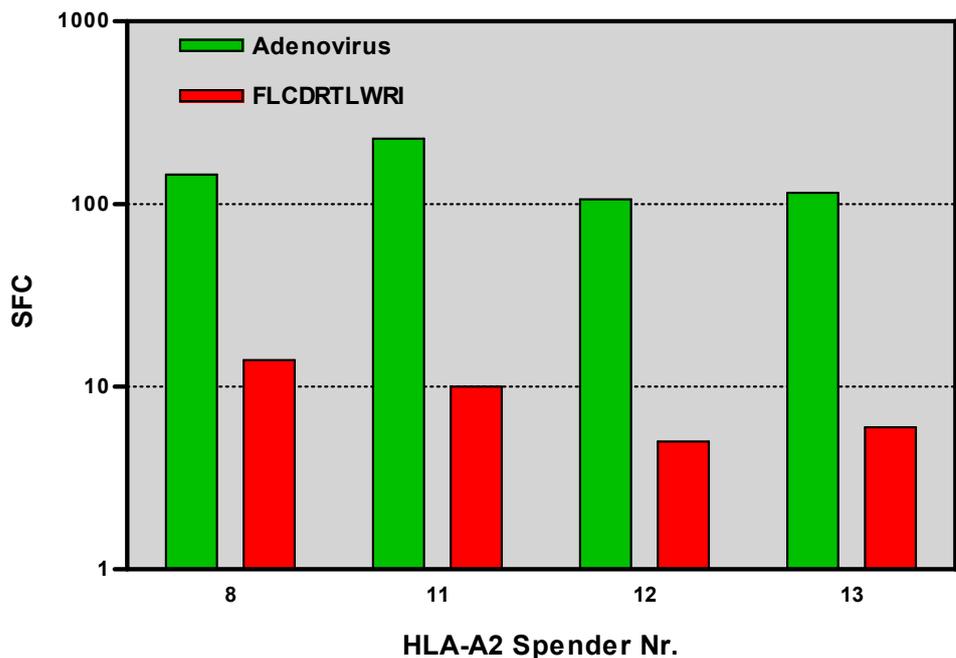


Abbildung 8:

IFN- γ -Antwort gesunder Spender auf mit positiver Antwort auf Adenovirus-Lysat und das HLA-A2 restringierte Dekapeptid 2200 mit der Aminosäuresequenz FLCDRTLWRI im ELISPOT:

Die adenoviruspezifische Antwort des Hexonpeptids FLCDRTLWRI beträgt bei Spender 8 maximal 10% der Antwort auf Adenovirus-Lysat.

3.2.3 Peptidscreening gesunder Spender der Klasse HLA-A24 im ELISPOT

Das Screening auf peptidspezifische Zellen bei Spendern der Klasse HLA-A24 ergibt, dass 3 Spender (=75%) positiv für das Dekapeptid 2230 mit der Aminosäuresequenz NYIAFRDNFI sind.

Der Median der Antwort auf das Dekapeptid 2230 mit der Aminosäuresequenz NYIAFRDNFI beträgt 5 SFC mit einem Minimum von 4 und einem Maximum von 14 SFC, der Mittelwert beträgt 7 SFC \pm 5.

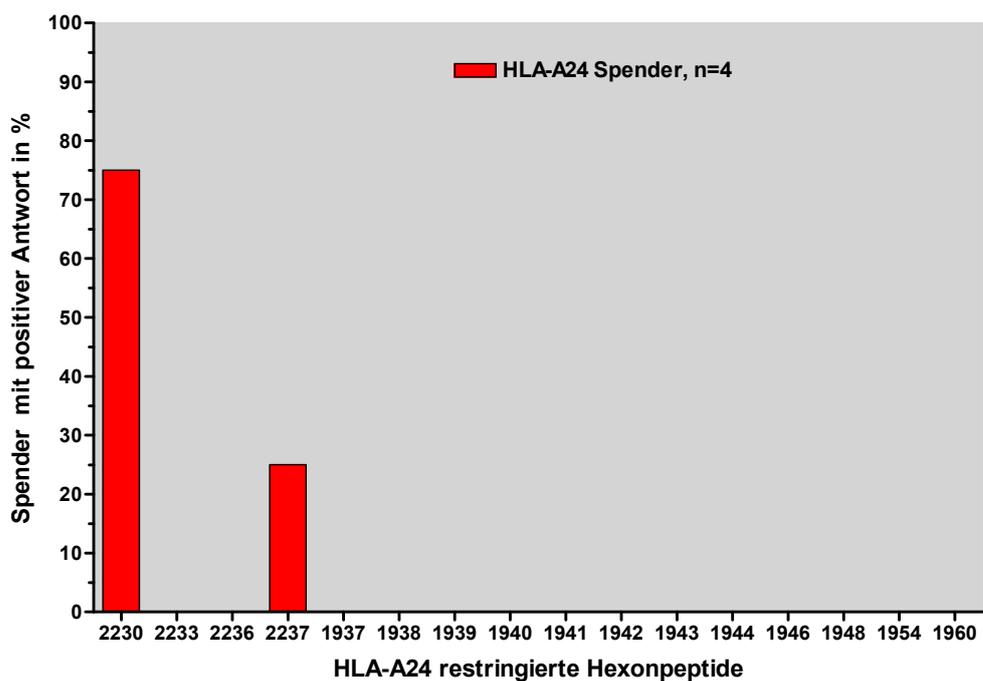


Abbildung 9:

Relativer Anteil gesunder Spender der Klasse HLA-A24, mit einer positiven Antwort im ELISPOT auf HLA-A24-restringierte Hexonpeptide:

3 von 4 Spendern sind positiv für das Peptid 2230.

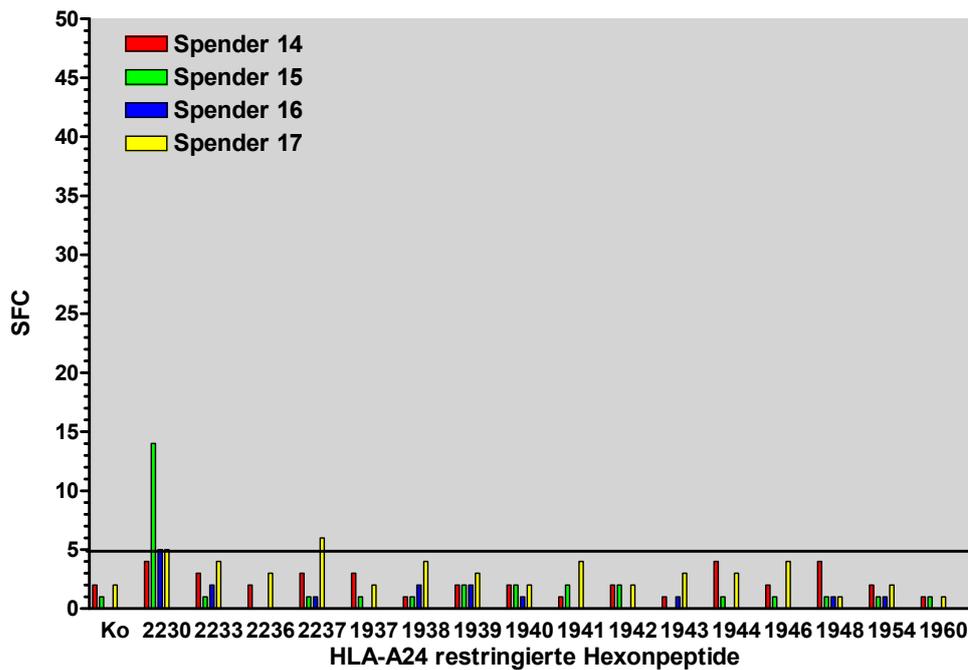


Abbildung 10:

IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A24 auf HLA-A24 restringierte Hexonpeptide im ELISPOT:

Spender 15 zeigt eine maximale Antwort auf das im ELISPOT immundominante Peptid 2230 von 14 SFC.

In Abbildung 11 wird die IFN- γ -Antwort der 3 positiven Spender auf das Hexonpeptid 2230 mit der Aminosäuresequenz NYIAFRDNFI der Antwort auf Adenovirus-Lysat gegenübergestellt.

Der Median der adenoviruspezifischen Antwort des Hexonpeptids NYIAFRDNFI beträgt 5,6% mit einem Minimum von 2,5% und einem Maximum von 6,0%, der Mittelwert beträgt 4,7% \pm 1,9.

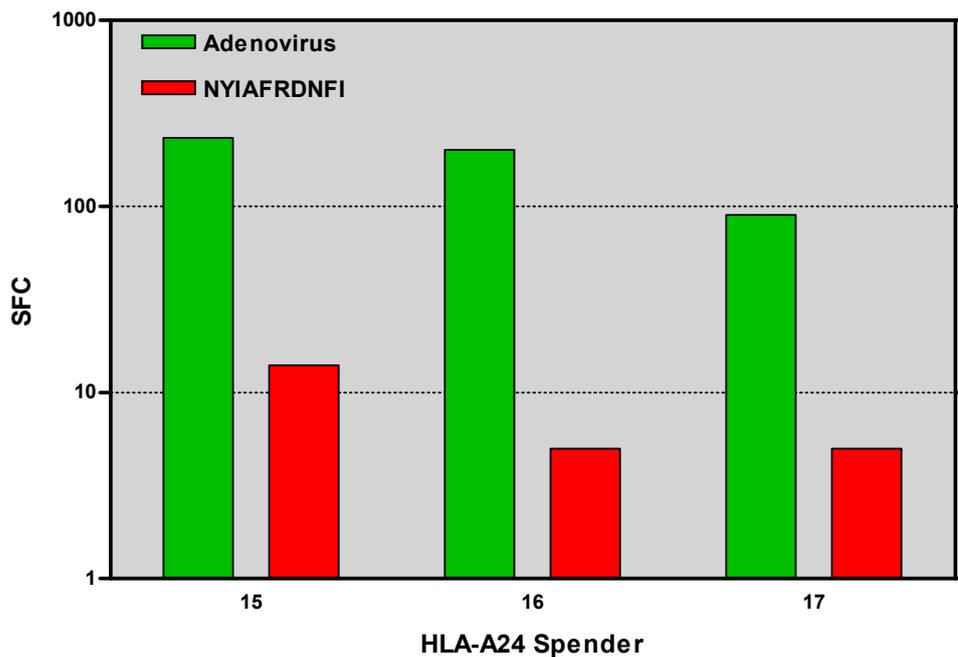


Abbildung 11:

IFN- γ -Antwort gesunder Spender auf Adenovirus-Lysat und das HLA-A24 restringierte Dekapeptid NYIAFRDNFI im ELISPOT:

Die adenoviruspezifische Antwort des Hexonpeptids NYIAFRDNFI beträgt bei Spender 15 maximal 6% der Antwort auf Adenovirus-Lysat.

3.3 Bestimmung der IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten nach Stimulation mit Hexonpeptiden mittels intrazellulärer Zytokinfärbung im Durchflußzytometer

Wie eingangs beim Screening auf adenoviruspezifische Zellen wird bei den einzelnen Spender eine Intrazellulärfärbung mit anschließender Messung im Durchflußzytometer durchgeführt. Es wird mit den Antikörpern CD3, CD4 und CD8 gefärbt. Stimuliert wird mit 1 μ g/ml Hexonpeptid sowie 1 μ g/ml CD28, welches als kostimulatorisches Molekül dient. Negativkontrolle sind Zellen ohne Peptid aber mit CD28, als Positivkontrolle dient Staphylokokkenenterotoxin B. Als positiv werden CD3⁺ - Zellen mit einem IFN-gamma-Nachweis $\geq 0,01\%$ vitale T-Zellen gewertet.

3.3.1 Bestimmung der IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten nach Stimulation mit Hexonpeptiden der Klasse HLA-A1

Das Hexonpeptid LTDLGQNLLY ist bei 83% der Spender positiv im ELISPOT mit einer Frequenz von $11\text{SFC} \pm 8$, bei Messung im Durchflußzytometer nach Intrazellulärfärbung ist es bei 67% der Spender positiv und zeigt sowohl eine CD3/CD8 als auch eine CD3/CD4 Antwort.

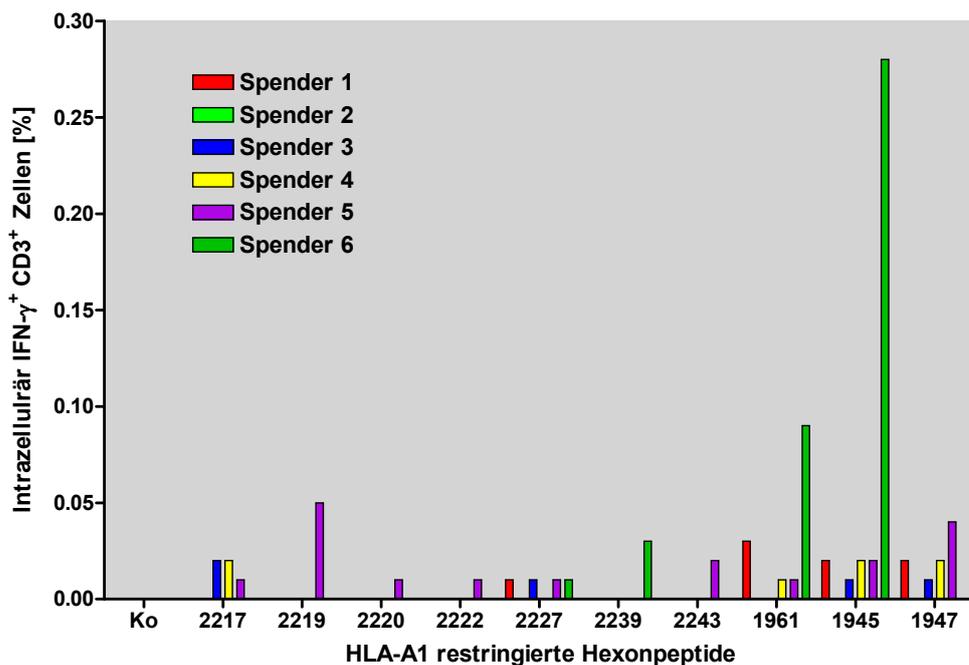


Abbildung 12:

IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A1 auf HLA-A1 restringierte Hexonpeptide nach Intrazellulärfärbung und Messung im Durchflußzytometer:

Von n=6 Spendern sind n=4 Spender (=67%) positiv für das HLA-A1 restringierte Dekapeptid 1945 mit der Aminosäuresequenz LTDLGQNLLY.

Der Mittelwert bei allen HLA-A1 Spendern für das Peptid 1945 beträgt bei den CD3⁺ - Zellen $0,04\% \pm 0,07$, der Median 0,02% bei einem Minimum von 0% und einem Maximum von 0,19%.

3.3.2 Bestimmung der IFN- γ Produktion von T-Lymphozyten nach Stimulation mit Hexonpeptiden der Klasse HLA-A2

Das im ELISPOT bei 57% der Spender positive HLA-A2 restringierte Hexonpeptid 2200 mit der Aminosäuresequenz FLCDRTLWRI ist bei der Messung im Durchflußzytometer nach Intrazellulärfärbung lediglich bei einem der Spender positiv.

Das im ELISPOT bei nur einem Spender positive Hexonpeptid 2271 ist bei 4 von 6 (=67%) Spendern bei der Intrazellulärfärbung positiv, das im ELISPOT ebenfalls negative Peptid 2198 ist bei allen Spendern bei der Intrazellulärfärbung positiv.

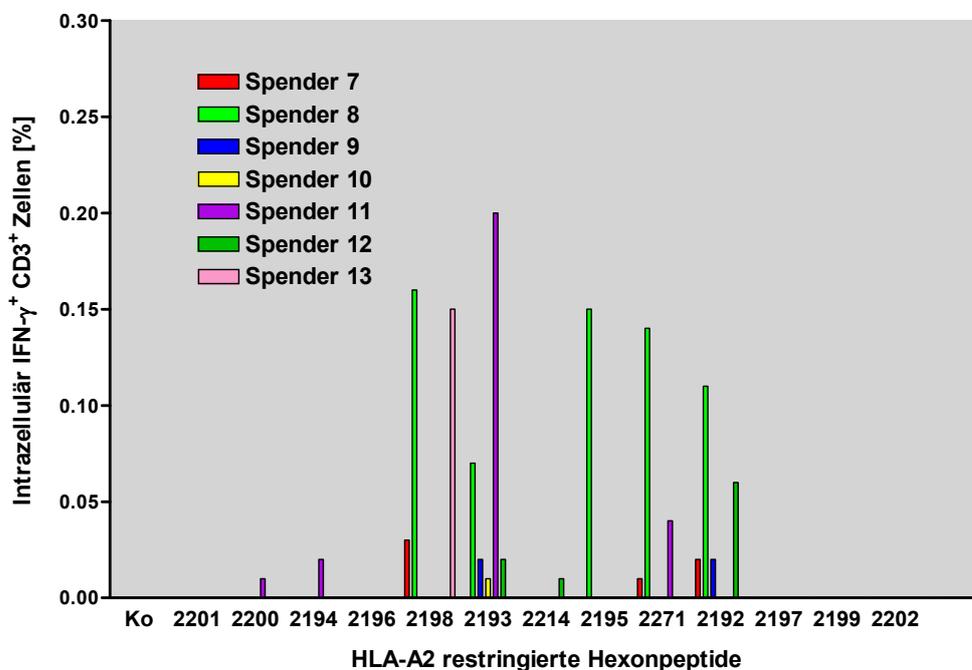


Abbildung 13:

IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A2 auf HLA-A2 restringierte Hexonpeptide nach Intrazellulärfärbung und Messung im Durchflußzytometer:

Das im ELISPOT negative Peptid 2198 zeigt in der Intrazellulärfärbung bei 4 von 7 Spendern eine positive Antwort.

3.3.3 Bestimmung der IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten nach Stimulation mit Hexonpeptiden der Klasse HLA-A24

Das beim peptidspezifischen Screening im ELISPOT bei 3 von 4 Spendern positive HLA-A24 restringierte Hexonpeptid 2230 mit der Aminosäuresequenz NYIAFRDNFI weist bei der Messung im Durchflußzytometer nach Intrazellulärfärbung bei keinem der Spender $>0,01\%$ CD3⁺ - Zellen auf. 8 von 16 HLA-A24 restringierten Peptide sind negativ in der Intrazellulärfärbung. Bei den übrigen 8 Hexonpeptiden ist nur das Dekapeptid 2237 mit der Aminosäuresequenz AYSYKARFTL bei allen Spendern positiv.

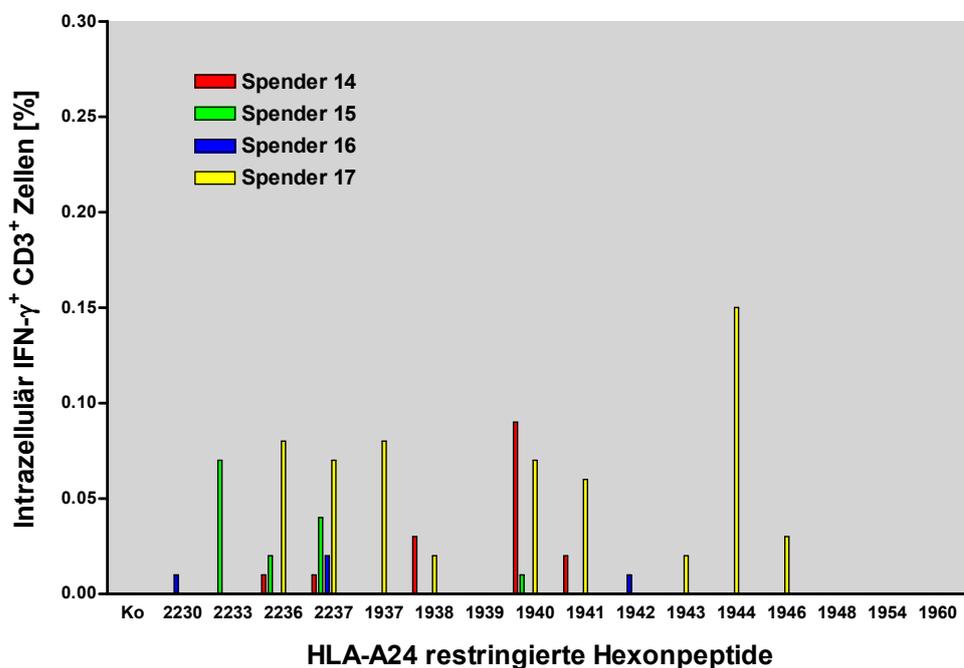


Abbildung 14:

IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A24 auf HLA-A24 restringierte Hexonpeptide nach Intrazellulärfärbung und Messung im Durchflußzytometer:

Das Dekapeptid 2237 mit der Aminosäuresequenz AYSYKARFTL ist bei allen Spendern positiv.

4. Diskussion

Die Stammzelltransplantation hat eine zunehmende Bedeutung bei der Behandlung benignen und malignen Erkrankungen erlangt. Um eine Transplantatabstossung zu verhindern, ist es nötig, den Patienten immunsuppressiv zu behandeln. Die Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation kann 3-6 Monate benötigen,^{2,43} so dass in dieser Periode aufgrund einer stark abgeschwächten T-Zell-Immunität virale Infektionen eine der häufigsten Gründe hoher Morbidität und Mortalität sind.^{21,37,47}

Bei Kindern zählen Adenovirusinfektionen zu den häufigsten viralen Pathogenen, welche nach Transplantation für eine erhöhte Mortalität und Morbidität verantwortlich sein können.^{17,44,67}

Aufgrund unzureichender medikamentöser Therapie sind neue Therapieverfahren wie die adoptive T-Zellimmuntherapie, die Infusion adenoviruspezifischer T-Zellen, gerichtet. Klinische Versuche, HAdV Infektionen bei immunsupprimierten Personen mittels Immuntherapie zu behandeln, sind limitiert durch ungenügendes Wissen um die relevanten Epitope, welche bei vielen pathogenen Adenoviren vorhanden sind.¹⁶ Wenn es möglich wäre, mehrere immundominante Epitope zu entdecken, so wäre die Anwendung der Immuntherapie einfacher und erfolgsversprechender. Es könnten dann Multimere und Peptide gewonnen werden, die HAdV-spezifische T-Zellen charakterisieren könnten. Ebenso könnte man multipeptidale oder multiepitopale Vakzinen herstellen, welche HAdV-spezifische CD4 und CD8 Antworten hervorrufen könnten.

In dieser Arbeit wurde die spezifische T-Zellantwort von 39 mittels Datenbank-gestützter Algorithmen vorhergesagter, HLA-restringierter Epitope ex-vivo an gesunden Spendern charakterisiert.

Die nachfolgenden zentralen Fragen sollen in der Diskussion der Ergebnisse als Orientierung dienen:

1. Wie ist die Antwort gesunder Spender gegen adenovirales Hexonprotein charakterisiert?

2. Weisen gesunde Spender eine spezifische T-Zellantwort gegen Epitope auf, welche mittels datenbankgestützter Vorhersagealgorithmen der MHC-Bindung sowie der proteomalen Prozessierung vorhergesagt wurden?
3. Gibt es Peptide die eine Immundominanz vorweisen (>50% positive Spender)?
4. Weisen einzelne Spender Besonderheiten in ihrer Immunantwort auf diese Epitope auf?

Gesunde Spender zeigen eine spezifische T-Zell-Antwort gegen adenovirales Hexonprotein

Nach ex-vivo Stimulation mit adenoviralem Hexonprotein und nachfolgender Analyse der spezifischen T-Zellaktivierung durch intrazelluläre IFN-gamma-Bestimmung waren 10 von 17 Spendern positiv (59% aller Spender), das heisst sie zeigten eine Frequenz von IFN- γ positiven Zellen von >0,01%. Die spezifische T-Zellantwort besteht aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Bei den 10 positiven Spender ist die T-Zell-Immunantwort vorwiegend CD4 dominiert mit einem Mittelwert von 0,09% CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Das Ergebnis der CD4⁺ T-Zelldominanz steht im Einklang mit Untersuchungen gesunder Probanden von Flomenberg et al.,¹⁸ welche aufzeigen, dass adenoviruspezifische CD4⁺ T-Zellen im Körper verbleibende Antigene erkennen und lebenslang eine Immunantwort auf Adenovirus auslösen. Entgegen den Untersuchungen von Sester et al., wonach mit zunehmendem Alter die Anzahl adenoviruspezifischer T-Zellen sinkt, wiesen die 17 verwendeten Spender kein altersabhängiges Absinken der adenoviruspezifischen T-Zellen auf.⁵⁷

Für eine akute T-Zellantwort sind jedoch nicht CD4⁺ T-Zellen, sondern zytotoxische T-Zellen essentiell. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die MHC-I Epitope des adenoviralen Hexonproteins untersucht.

Datenbankgestützte Vorhersagealgorithmen der MHC-Bindung und der proteasomalen Prozessierung ergeben eine Vielzahl möglicher T-Zellepitope

Auf Motiven basierende Vorhersagen haben MHC-Klasse-I restringierte Peptide geliefert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Bei der Vorhersagemethode der Datenbank SYFFPEITHI werden die Werte aller möglichen Nonamere einer gegebenen Sequenz zusammen addiert, das optimale T-Zell-Epitop wird unter den zehn den höchsten Wert erreichenden Peptiden jedes Proteins erwartet. Jedoch können theoretische Annäherungen nicht immer Erfolg garantieren. So sind immerhin 10% der Vorhersagen immer noch nicht in der Lage, das zugehörige Epitop zu finden da noch nicht alle Details des Motivs vollständig verstanden sind. Epitopvorhersagen sind daher nur für eine kleine Anzahl von MHC-Allelen möglich, da alle Vorhersagen mehreren Kontrollzyklen unterliegen und eine bestimmte Anzahl von natürlichen Liganden und T-Zell-Epitopen erhältlich sein müssen um eine präzise und zuverlässige Vorhersage sicherzustellen.⁵³

Der Hauptgrund, theoretische Algorithmen zur Epitopvorhersage zu entwickeln liegt darin, Zeit zu sparen. Anstatt duzende oder gar hunderte Peptide zu synthetisieren und zu testen erhält man so eine kleine Vorauswahl weniger Peptide.

Von 39 auf diese Weise ermittelten Peptiden erwies sich nur eines, das HLA-A1 Peptid 1945 mit der Aminosäuresequenz LTDLGQNLLY, als immundominantes Peptid, was mit zwei Methoden gezeigt werden konnte.

Die Frequenz HAdV spezifischer T-Zellen ist extrem gering. Daher wurden mit einer Testung ex vivo nur die starken Antigene identifiziert und solche deren Antwort unter der Nachweisgrenze lag nicht erkannt.

Gesunde Spender weisen auf manche dieser Epitope eine spezifische T-Zellantwort auf

Die auf Adenovirus-Lysat positiven Spender weisen ebenso eine adenovirusspezifische Antwort auf Hexonpeptide auf. Interessanterweise zeigte sich dass teilweise auch auf HAdV-Lysat negative Spender IFN- γ -Antworten auf Hexonpeptide zeigten. So waren die 3 anfangs negativen HLA-A2 Spender 7,9,13 (siehe Tabelle 2.1 Probanden) im weiteren Verlauf alle drei positiv in der intrazellulären IFN- γ -Messung für das Peptid 2198, im ELISPOT konnte dies dagegen nicht bestätigt werden. Ein weiterer für HAdV-Lysat negativer, HLA-A24 Spender, Spender Nr. 14, war bei der intrazellulären Zytokinmessung positiv für das Peptid 1940 (von Leen et al. 2004 als immundominantes Peptid beschrieben) sowie im ELISPOT positiv für das Peptid 2230.

Leen et al.³⁸ verwendeten einen „Peptidpool“, jedoch nicht ex-vivo, sondern an HAdV spezifischen T-Zelllinien. Die klinische Relevanz eines solchen Peptidpools wird dadurch hervorgehoben, dass Heemskerk et al. über Kreuzreaktivität adenovirusspezifischer T-Zellen bei gesunden Spendern²⁴ berichteten. So zeigten auf HAdV Serotyp 5 spezifische T-Zellen ebenso eine IFN-gamma Antwort gegen andere Subtypen. Ebenso berichteten Veltrop-Duits et al. über 5 konservierte Peptide mit 30 Aminosäuren Länge, welche bei einem Grossteil der untersuchten Spender erkannt wurden.⁶³ Mit diesen Peptiden kultivierte, CD4⁺ T-Zellen waren in der Lage, infizierte Zellen verschiedener HAdV-Spezies zu erkennen. Diese Daten über die Kreuzreaktivität immundominanter, konservierter Peptide sprechen für eine Verwendung eines „Peptidmix“ als Screening auf adenovirusspezifische T-Zellen. Ebenso ist die Kreuzreaktivität verschiedener Peptide auf verschiedene Serotypen von Adenoviren erwünscht bei einer adoptiven Immuntherapie mit peptidspezifischen T-Zellen, da so unabhängig vom infizierenden Serotyp HAdV-spezifische T-Zellen gewonnen werden können.

Das Dekapeptid 1945 zeigt eine Immundominanz und ist sowohl im ELISPOT als auch im FACS bei der Mehrzahl der Spender positiv

Von den 6 HLA-A1 Spendern in Abbildung 3.3 sind 83% positiv für 1945, welches die Aminosäuresequenz LTDLGQNLLY aufweist. Von den 5 positiven Spendern beträgt bei 4 Spendern die Antwort des Hexonpeptids maximal 15,5% der Antwort auf ganzes adenovirales Protein. Bei Spender 6 hingegen weist die Antwort auf das Dekapeptid 1945 einen Anteil von 33,8% auf. Dies entspricht dem Verhältnis, welches Olive et. al bei der Entdeckung des ersten immundominanten HLA-A2 restringierten Hexonpeptids identifiziert haben.⁵¹

Leen et al. haben 5 immundominante CD8 T-Zellepitope entdeckt, darunter ein Nonapeptid mit der Aminosäuresequenz TDLGQNLLY, welches bis auf die zusätzliche Aminosäure Leucin am Anfang identisch ist mit dem immundominanten Peptid 1945 mit der Aminosäuresequenz LTDLGQNLLY.⁴⁰

Bei Messung im Durchflußzytometer nach Intrazellulärfärbung ist es bei 67% der Spender positiv und zeigt sowohl eine T-Zellantwort von CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen als auch CD3⁺/, wobei die Antwort der CD4⁺ T-Zellen stärker ausgeprägt ist.

Olive et al. haben bereits 2002 17 Nonapeptide getestet mit dem Ergebnis, dass ein Nonapeptid, in unserer Arbeit ebenso vorhanden mit der Nummer 2271, bei 5 von 6 HLA-A2 Spendern positiv war sowie bei 4 von 6 HLA-A2 negativen Spendern positiv war.⁵¹ Als optimales Epitop haben Olive et al. ein längeres, 15 Aminosäuren enthaltendes Peptid identifiziert, welches das erste entdeckte MHC-Klasse-II restringierte Hexonpeptid von Adenoviren war. Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Peptid 1945 ein relevantes Epitop für CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, jedoch ein höher potentes Antigen für CD4⁺ T-Helferzellen. Ob der Unterschied der einen Aminosäure für die Antigenität ein relevanter Unterschied ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Ebenso sollte durch weitere Untersuchungen die HLA-Restriktion des HLA-A1 Peptids 1945 eingehender untersucht werden. HLA-A1 negative Spender sollten ausgetestet werden, um eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen HLA-Typen aufzuzeigen.

Gesunde Spender weisen mono-, oligo- und poly- Epitop Antworten auf

Die überwiegende Anzahl der Spender (11 von 17) weist oligo Epitop Antworten auf, das heisst es findet sich eine Antwort auf weniger als 6 Epitope. 5 von 17 Spender sind auf mehr als 6 Epitope positiv, 1 Spender ist nur auf ein Epitop positiv.

4 von 6 Spendern sind in beiden verwendeten Methoden positiv für das HLA-A1 Peptid 1945, bei den HLA-A2 restringierten Peptiden sind 2 Spender doppelt positiv für das Peptid 2192 sowie ein Spender positiv für das Peptid 2200. Bei den HLA-A24 restringierten Peptiden ist je 1 Spender in beiden verwendeten Methoden positiv für die Peptide 2230 und 2237.

Immer mehr Untersuchungen deuten daraufhin, dass für eine suffiziente T-Zellantwort sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen essentiell sind.^{6,7,39,49} Leen et al. fanden bei Untersuchungen an HAdV spezifischen T-Zelllinien heraus, dass die Mehrzahl der untersuchten T-Zelllinien (18 von 26) zwischen 2 und 10 verschiedene Epitope erkennen. Lediglich 7 T-Zelllinien reagieren nur auf ein Epitop. In 4 von 19 T-Zelllinien fanden sie eine Reaktion auf nur ein einzelnes CD4⁺ T-Zellepitop, während 14 dieser T-Zelllinien auf mehr als 3 CD4⁺ T-Zellepitope reagierten. Dagegen erkannten 15 von 19 T-Zelllinien ein einzelnes CD8⁺ T-Zellepitop. Leen et al. folgern daraus, dass die Immunantwort gegen Hexonprotein durch CD4⁺ T-Zellen dominiert ist und diese sich gegen multiple MHC-II Epitope richtet, wohingegen CD8⁺ T-Zellepitope eine niedrigere Frequenz aufweisen und insgesamt weniger Epitope zu finden sind. Sie fanden jedoch ebenso 5 immundominante Peptide, die sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen stimulierten.³⁸ Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die Suche nach immundominanten, zur Immuntherapie geeigneten Epitopen weiterhin vor allem darauf abzielen, solche Epitope zu finden, welche sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen stimulieren können und dies auch bei einer Mehrzahl der untersuchten Spender positive Antworten hervorruft.

Die verwendeten Methoden bieten die Möglichkeit einer ex-vivo Analyse verbunden mit einer funktionellen Aussage durch Zytokinsekretion

Die verwendeten Methoden zum Nachweis einer spezifischen T-Zellantwort, die intrazelluläre Zytokinfärbung sowie der ELISPOT-Test, haben eine hohe Sensitivität für die extrem niedrige Frequenz HAdV spezifischer T-Zellen.

Sie bieten die Möglichkeit einer ex-vivo Analyse verbunden mit einer funktionellen Aussage durch Nachweis von Zytokinsekretion.

Der ELISPOT-Test ist eine Variante des Sandwich-ELISA-Tests, der bei der Bestimmung der Häufigkeit von T-Zellreaktionen angewendet wird. Die Vorteile dieser Methode sind die gute Reproduzierbarkeit, eindeutige Ergebnisse in Form von klar abgrenzbaren SFC= Spot Forming Cells sowie die Möglichkeit, mit einer Platte eine Vielzahl von Proben messen zu können.

Die SFC, also Zellen, welche IFN- γ produzieren und was mittels gebundenen Antikörpern sichtbar gemacht werden kann, können sowohl von aktivierten T-Lymphozyten stammen als auch von anderen IFN- γ produzierenden Zellen wie Monozyten. Aufgründessen ist eine weitere, spezifischere Methode wie die Messung mit dem Durchflusszytometer nach erfolgter intrazellulärer Zytokinfärbung, vonnöten, um klare Aussagen über die Herkunft des produzierten IFN- γ zu treffen.

Die intrazelluläre FACS-Färbung ermöglicht die Messung intrazellulärer Antigene unter der Voraussetzung, dass spezifische Antikörper verwendet werden. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran können Antikörper zu den intrazellulären Strukturen vordringen und wodurch die intrazelluläre Zytokinanalyse möglich wird. Wenn diese Permeabilisierung ungenügend ist, wird eine normalerweise IFN- γ positive Zelle als negativ eingestuft, es erscheint ein falsch negatives Ergebnis. Vorteile der intrazellulären Zytokinfärbung sind neben der bereits oben genannten höheren Spezifität, dass eine quantitative Antwort auf Antigene mittels Effektorzytokinnachweis möglich wird. Ebenso weist das Verfahren der intrazellulären Zytokinfärbung eine deutlich höhere Sensitivität als andere Verfahren, auch als das Verfahren des ELISPOT, auf: so weisen laut Waldrop

et al. untersuchte Spender im ELISPOT Frequenzen CMV-spezifischer, mononukleärer Zellen von 1:1000-1:10.000 auf, wohingegen bei der intrazellulären Zytokinfärbung dieselben Spender Frequenzen von 1:1000 bis 1:200 CD4 positive Zellen aufweisen.⁶⁵ Die Tatsache, dass das HLA-A2 Peptid 2198 bei 4 Spendern in der Intrazellulärfärbung positiv ist, während es im ELISPOT negativ ist, kann dadurch erklärt werden, dass bei der Intrazellulärfärbung bei mehr als 100.000 gezählten Events (entsprechend mehr als 100.000 T-Zellen) die Wahrscheinlichkeit, ein positives Peptid zu detektieren, höher ist als im ELISPOT, bei dem je Well lediglich ca. 50.000 T-Zellen vorhanden sind.

Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass gesunde Spender ex-vivo eine adenoviruspezifische T-Zellantwort auf synthetisch hergestellte, mittels Datenbank-gestützter Vorhersagealgorithmen ermittelte Hexonpeptide, zeigen.

Die Antworten der Spendern richteten sich zum grössten Teil gegen verschiedene Epitope. Es zeigten sich Unterschiede im Vergleich der beiden verwendeten Methoden: Während beim ELISPOT mono- und oligoepitopale Antworten überwiegen, können nach Intrazellulärfärbung und Messung im Durchflusszytometer vor allem oligo- und polyepitopale Antworten beobachtet werden. Dies könnte durch unterschiedliche Spezifität und Sensitivität der beiden Methoden erklärt werden. Das Peptid 1945 weist als einziges aller 39 untersuchten Peptide eine Immundominanz auf und stimuliert sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen. Es sollte durch weitergehende Untersuchungen wie Tetramerfärbung und Zytotoxizitätstests der Frage nachgegangen werden, inwieweit das Peptid 1945 bei HLA-identischen sowie auch anderen HLA-Typen dazu geeignet ist, adenoviruspezifische T-Zelllinien zu generieren.

5. Zusammenfassung

Die Adenovirusinfektion bei Kindern nach allogener Stammzelltransplantation verursacht eine relevante Mortalität und Morbidität. Für eine rasche T-Zellantwort sind nicht $CD4^+$ T-Zellen, sondern zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen essentiell. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die MHC-I Epitope des adenoviralen Hexonproteins untersucht. Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung neuer adenoviraler T-Zellepitope, um eine spezifische T-Zellantwort gegen HAdV besser charakterisieren zu können und damit diagnostische und therapeutische Verbesserungen im Umgang mit HAdV Infektionen zu ermöglichen. Dabei wurden mittels Datenbank-gestützter Algorithmen HLA-A1, A2 und A24 restringierte Epitope aus dem adenoviralen Hexonprotein vorhergesagt und 39 Hexonpeptide synthetisch hergestellt. Für die Charakterisierung der spezifischen T-Zellantwort auf diese MHC-restringierten Peptide werden 17 gesunde Spender untersucht, insgesamt werden 39 MHC-I restringierte Peptide mittels ELISPOT und intrazellulärer Zytokinfärbung ausgetestet.

Bei den HLA-A1 Spendern erwies sich das HLA-A1 Peptid 1945 mit der Aminosäuresequenz LTDLGQNLLY als immundominantes Peptid, welches bei 83% der Spender positiv im ELISPOT ist, bei Messung im Durchflußzytometer nach Intrazellulärfärbung ist es bei 67% der Spender positiv und zeigt sowohl eine $CD3/CD8$ als auch eine $CD3/CD4$ Antwort. Leen et al. publizierten 2004 ein bis auf 1 Aminosäure abweichendes HLA-A1 restringiertes Hexonpeptid, welches bei 6 von 6 Spendern positiv war. Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Peptid 1945 ein relevantes Epitop für $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen und ebenfalls ein potentes Antigen für $CD4^+$ T-Helferzellen.

Die HLA-A2 und A24 Spender weisen eine erhebliche Interspendervarianz auf: Die Epitoppräferenz der T-Zellantwort einzelner Spender richtet sich reproduzierbar gegen nicht-immundominante Peptide, so dass kein Peptid bei mehr als 2 Spendern in beiden Methoden positiv ist.

Zusammenfassend zeigt sich für das adenovirale Hexonprotein sowohl eine interindividuellen Präferenz in der Auswahl der T-Zellepitope als auch ein immudominantes Epitop für HLA-A1.

6. Literaturverzeichnis

1. Andre-Schmutz,I. *et al.* Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet* **360**, 130-137 (2002).
2. Bahceci,E. *et al.* Early reconstitution of the T-cell repertoire after non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation is from post-thymic T-cell expansion and is unaffected by graft-versus-host disease or mixed chimaerism. *Br. J. Haematol.* **122**, 934-943 (2003).
3. Baldwin,A. *et al.* Outcome and clinical course of 100 patients with adenovirus infection following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **26**, 1333-1338 (2000).
4. Barbera,J.A. *et al.* Undetected viral infection in diffuse alveolar damage associated with bone marrow transplantation. *Eur. Respir. J.* **9**, 1195-1200 (1996).
5. Bergelson,J.M. *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323 (1997).
6. Bioley,G. *et al.* Melan-A/MART-1-specific CD4 T cells in melanoma patients: identification of new epitopes and ex vivo visualization of specific T cells by MHC class II tetramers. *J. Immunol.* **177**, 6769-6779 (2006).
7. Boon,T., Coulie,P.G., Van den Eynde,B.J. & van der,B.P. Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 175-208 (2006).
8. Bordigoni,P., Carret,A.S., Venard,V., Witz,F. & Le Faou,A. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1290-1297 (2001).
9. Burgert,H.G. *et al.* Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **269**, 273-318 (2002).
10. Carrigan,D.R. Adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am. J. Med.* **102**, 71-74 (1997).
11. Chakrabarti,S., Collingham,K.E., Fegan,C.D., Pillay,D. & Milligan,D.W. Adenovirus infections following haematopoietic cell transplantation: is there a role for adoptive immunotherapy? *Bone Marrow Transplant.* **26**, 305-307 (2000).
12. Chakrabarti,S. *et al.* Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation,

- immunosuppression, and immune recovery. *Blood* **100**, 1619-1627 (2002).
13. Claas,E.C. *et al.* Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1738-1744 (2005).
 14. Dalapathy,S., Lily,T.K., Roy,S. & Madhavan,H.N. Development and use of nested polymerase chain reaction (PCR) for the detection of adenovirus from conjunctivitis specimens. *J. Clin. Virol.* **11**, 77-84 (1998).
 15. Feuchtinger,T. *et al.* Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **128**, 503-509 (2005).
 16. Feuchtinger,T. *et al.* Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **134**, 64-76 (2006).
 17. Flomenberg,P. *et al.* Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* **169**, 775-781 (1994).
 18. Flomenberg,P., Piaskowski,V., Truitt,R.L. & Casper,J.T. Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus. *J. Infect. Dis.* **171**, 1090-1096 (1995).
 19. Giralto,S.A. & Champlin,R.E. Leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation: a review. *Blood* **84**, 3603-3612 (1994).
 20. Hale,G.A. *et al.* Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **23**, 277-282 (1999).
 21. Handgretinger,R. *et al.* Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **938**, 340-357 (2001).
 22. Heemskerk,B. *et al.* Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J. Infect. Dis.* **191**, 520-530 (2005).
 23. Heemskerk,B. *et al.* Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J. Infect. Dis.* **191**, 520-530 (2005).
 24. Heemskerk,B. *et al.* Extensive cross-reactivity of CD4+ adenovirus-specific T cells: implications for immunotherapy and gene therapy. *J. Virol.* **77**, 6562-6566 (2003).
 25. Hierholzer,J.C. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 262-274 (1992).

26. Hierholzer, J.C., Halonen, P.E., Dahlen, P.O., Bingham, P.G. & McDonough, M.M. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1886-1891 (1993).
27. Hilleman, M.R. & Werner, J.H. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **85**, 183-188 (1954).
28. Hoffman, J.A., Shah, A.J., Ross, L.A. & Kapoor, N. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **7**, 388-394 (2001).
29. Howard, D.S. *et al.* Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1494-1501 (1999).
30. Hromas, R., Cornetta, K., Srour, E., Blanke, C. & Broun, E.R. Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* **84**, 1689-1690 (1994).
31. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & *et al.* Immunobiology-the immune system in health and disease 5th edition. Part I-V. 2001. London, Garland publishing.
32. Klein, J. & Sato, A. The HLA system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**, 702-709 (2000).
33. Ko, G., Cromeans, T.L. & Sobsey, M.D. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7377-7384 (2003).
34. Koehl, U. *et al.* Immune recovery in children undergoing allogeneic stem cell transplantation: absolute CD8+ CD3+ count reconstitution is associated with survival. *Bone Marrow Transplant.* **39**, 269-278 (2007).
35. Kojaoghlanian, T., Flomenberg, P. & Horwitz, M.S. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev. Med. Virol.* **13**, 155-171 (2003).
36. La Rosa, A.M. *et al.* Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 871-876 (2001).
37. Lang, P. *et al.* Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood* **101**, 1630-1636 (2003).
38. Leen, A.M. *et al.* Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy. *J. Virol.* **82**, 546-554 (2008).

39. Leen,A.M. *et al.* Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat. Med.* **12**, 1160-1166 (2006).
40. Leen,A.M. *et al.* Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8+ T cells. *Blood* **104**, 2432-2440 (2004).
41. Legrand,F. *et al.* Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant.* **27**, 621-626 (2001).
42. Leruez-Ville,M. *et al.* Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 45-52 (2004).
43. Lewin,S.R. *et al.* Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood* **100**, 2235-2242 (2002).
44. Lion,T. *et al.* Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* **102**, 1114-1120 (2003).
45. Ljungman,P., Gleaves,C.A. & Meyers,J.D. Respiratory virus infection in immunocompromised patients. *Bone Marrow Transplant.* **4**, 35-40 (1989).
46. Miyamura,K. *et al.* Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors. *Bone Marrow Transplant.* **25**, 545-548 (2000).
47. Mohty,M. *et al.* Infectious complications following allogeneic HLA-identical sibling transplantation with antithymocyte globulin-based reduced intensity preparative regimen. *Leukemia* **17**, 2168-2177 (2003).
48. Morfin,F. *et al.* In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir. Ther.* **10**, 225-229 (2005).
49. Myers,G.D. *et al.* Reconstitution of adenovirus-specific cell-mediated immunity in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **39**, 677-686 (2007).
50. Nemerow,G.R. & Stewart,P.L. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 725-734 (1999).

51. Olive,M., Eisenlohr,L., Flomenberg,N., Hsu,S. & Flomenberg,P. The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1167-1178 (2002).
52. Raboni,S.M., Siqueira,M.M., Portes,S.R. & Pasquini,R. Comparison of PCR, enzyme immunoassay and conventional culture for adenovirus detection in bone marrow transplant patients with hemorrhagic cystitis. *J. Clin. Virol.* **27**, 270-275 (2003).
53. Rammensee,H., Bachmann,J., Emmerich,N.P., Bajor,O.A. & Stevanovic,S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213-219 (1999).
54. Reddy,P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol. Oncol.* **21**, 149-161 (2003).
55. Runde,V. *et al.* Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. *Bone Marrow Transplant.* **28**, 51-57 (2001).
56. Sester,M. *et al.* Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* **71**, 1287-1294 (2001).
57. Sester,M. *et al.* Age-related decrease in adenovirus-specific T cell responses. *J. Infect. Dis.* **185**, 1379-1387 (2002).
58. Shayakhmetov,D.M. *et al.* The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses. *J. Virol.* **77**, 3712-3723 (2003).
59. Shields,A.F., Hackman,R.C., Fife,K.H., Corey,L. & Meyers,J.D. Adenovirus infections in patients undergoing bone-marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **312**, 529-533 (1985).
60. Speer C. & Gahr,M. Das Kinderheilkunde-Buch für junge Pädiater. 1. Auflage. Springer Verlag Heidelberg Berlin.
61. van Tol,M.J. *et al.* Adenovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation: diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplant.* **35 Suppl 1**, S73-S76 (2005).
62. van Tol,M.J. *et al.* Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* **36**, 39-50 (2005).

63. Veltrop-Duits, L.A. *et al.* Human CD4+ T cells stimulated by conserved adenovirus 5 hexon peptides recognize cells infected with different species of human adenovirus. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2410-2423 (2006).
64. Venard, V., Carret, A., Corsaro, D., Bordigoni, P. & Le Faou, A. Genotyping of adenoviruses isolated in an outbreak in a bone marrow transplant unit shows that diverse strains are involved. *J. Hosp. Infect.* **44**, 71-74 (2000).
65. Waldrop, S.L., Pitcher, C.J., Peterson, D.M., Maino, V.C. & Picker, L.J. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J. Clin. Invest* **99**, 1739-1750 (1997).
66. Walls, T. *et al.* Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation: is treatment always necessary? *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1244-1249 (2005).
67. Walls, T., Shankar, A.G. & Shingadia, D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 79-86 (2003).
68. Wasserman, R., August, C.S. & Plotkin, S.A. Viral infections in pediatric bone marrow transplant patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 109-115 (1988).
69. Watanabe, M. *et al.* Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR Green real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatr. Int.* **47**, 286-291 (2005).
70. Weisdorf, D.J. *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukaemia: risk factors and clinical outcome. *Br. J. Haematol.* **86**, 62-69 (1994).
71. Woodard, P. *et al.* Etiology and outcome of graft failure in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **25**, 955-959 (2003).
72. Zanetti, A. *et al.* Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane. *Blood* **84**, 1116-1123 (1994).

7. Anhang

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: T-Zellantwort gesunder Spender auf komplettes HADV

Abbildung 2: IFN- γ Antworten auf Mock-Kontrolle und auf Adenovirus-Lysat

Abbildung 3: Relativer Anteil gesunder Spender der Klasse HLA-A1, mit einer positiven Antwort im ELISPOT auf HLA-A1-restringierte Hexonpeptide

Abbildung 4: IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A1 auf HLA-A1 restringierte Hexonpeptide im ELISPOT

Abbildung 5: IFN- γ -Antwort gesunder Spender auf Adenovirus-Lysat und das HLA-A1 restringierte Dekapeptid LTDLGQNLLY im ELISPOT

Abbildung 6: Relativer Anteil gesunder Spender der Klasse HLA-A2, mit einer positiven Antwort im ELISPOT auf HLA-A2-restringierte Hexonpeptide.

Abbildung 7: IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A2 auf HLA-A2 restringierte Hexonpeptide im ELISPOT, Mittelwerte aller Spender

Abbildung 8: IFN- γ -Antwort gesunder Spender auf mit positiver Antwort auf Adenovirus-Lysat und das HLA-A2 restringierte Dekapeptid 2200 mit der Aminosäuresequenz FLCDRTLWRI im ELISPOT

Abbildung 9: Relativer Anteil gesunder Spender der Klasse HLA-A24, mit einer positiven Antwort im ELISPOT auf HLA-A24-restringierte Hexonpeptide.

Abbildung 10: IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A24 auf HLA-A24 restringierte Hexonpeptide im ELISPOT

Abbildung 11: IFN- γ -Antwort gesunder Spender auf Adenovirus-Lysat und das HLA-A24 restringierte Dekapeptid NYIAFRDNFI im ELISPOT

Abbildung 12: IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A1 auf HLA-A1 restringierte Hexonpeptide nach Intrazellulärfärbung und Messung im Durchflußzytometer

Abbildung 13: IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A2 auf HLA-A2 restringierte Hexonpeptide nach Intrazellulärfärbung und Messung im Durchflußzytometer

Abbildung 14: IFN- γ -Antwort gesunder Spender der Klasse HLA-A24 auf HLA-A24 restringierte Hexonpeptide nach Intrazellulärfärbung und Messung im Durchflußzytometer

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Daten der Spender

Tabelle 2: MHC-Klasse-I restringierte Hexonpeptide

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. D. Niethammer für die Möglichkeit, dieses Projekt an der Kinderklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen bearbeiten zu dürfen.

Bei Herrn Dr. med. T. Feuchtinger bedanke ich mich für die kompetente und engagierte Betreuung während der experimentellen Arbeiten im Labor. Auch darüber hinaus hatte er immer ein offenes Ohr für meine Fragen und begleitete die Fertigstellung meiner Arbeit mit Wohlwollen und konstruktiver Kritik.

Allen Mitarbeitern des KMT-Labors möchte ich für die Unterstützung und Hilfe während der Fertigstellung der Experimente danken.

Meinen Eltern möchte ich für die grosszügige und herzliche Unterstützung während meines Medizinstudiums und darüber hinaus danken. Ebenso danke ich meiner Schwester für Ihre jederzeit optimistische Sichtweise, wenn ich mal mit der Arbeit nicht weiterkam. Die Unterstützung durch meine Familie hat massgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Oliver Bičanić
Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 02.11.1980
Geburtsort: Backnang

Schulbildung:

1986-1990: Eduard-Mörke-Grundschule in Backnang
1990-2000: Gymnasium in der Taus in Backnang

Hochschulbildung:

10/00-11/07 Studium der Humanmedizin,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
23/11/07 Staatsexamen
10/03-03/04 Forschungssemester im KMT-Labor
der Kinderklinik Tübingen
10/06-11/06 Pädiatrischer Studententutor in
der Kinderklinik Tübingen

Praktisches Jahr:

10/06-02/07 Pädiatrie
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
02/07-04/07 Innere Medizin
Kantonsspital Schwyz, Schweiz
04/07-06/07 Innere Medizin
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
06/07-09/07 Chirurgie
Regionalspital Leuggern, Schweiz

Beruflicher Werdegang:

01/08-07/08 Assistenzarzt in der Kinderklinik Tübingen
ab 08/08 Assistenzarzt in der Kinderklinik Esslingen